

QD
1
S923

ARKIV FÖR KEMI

UTGIVET AV

K. SVENSKA VETENSKAPSAKADEMIEN

Band 1

Med 65 avhandlingar

STOCKHOLM

ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI AB

LONDON

H. K. LEWIS & CO., LTD
136, COWER STREET

1950

PARIS

LIBRAIRIE C. KLINCKSIECK
11 RUE DE LILLE

Häfte 1 innehållande Nr 1—12 utkom den 9 sept. 1949

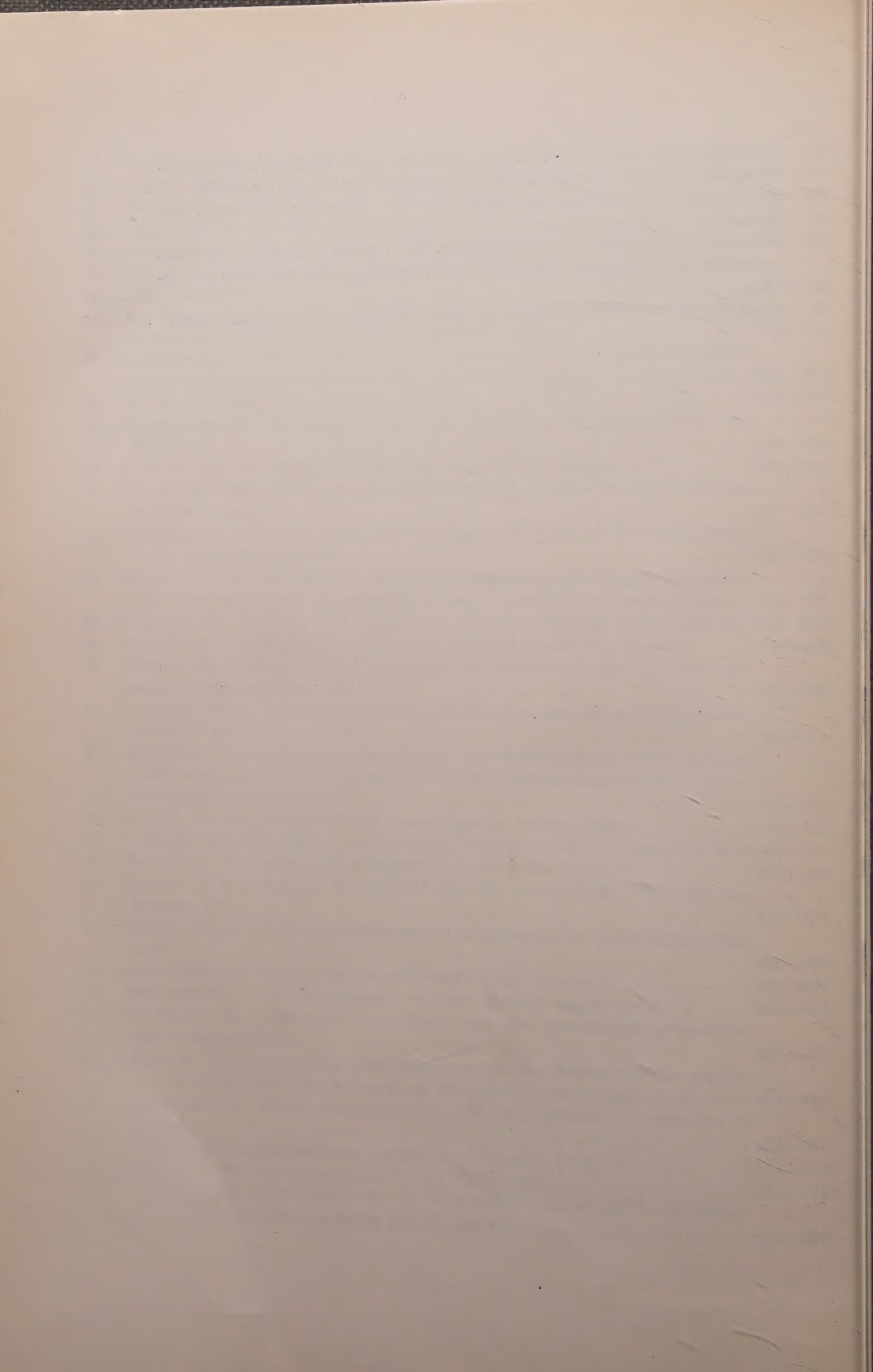
» 2	»	Nr 13—21	»	»	13 okt. 1949
» 3	»	Nr 22—34	»	»	19 » 1949
» 4	»	Nr 35—44	»	»	23 mars 1950
» 5	»	Nr 45—54	»	»	28 » 1950
» 6	»	Nr 55—65	»	»	17 april 1950

FÖRSTA BANDETS INNEHÅLL

	Sid.
1. MYRBÄCK, K. & SIHLBOM, E., Wirkung der Malzamy lasen auf niedrigmolekulare Hydrolyseprodukte der Stärke	1— 16
2. LINDBERG, O. & HUMMEL, J. P., On the measurement of radioactivity from paper chromatogram	17— 19
3. WEIBULL, C., Morphological studies on salt precipitated bacterial flagella . .	21— 22
4. v. EULER, H. & HAHN, L., Ribonucleic acid in plants	23— 26
5. BÄNG, F., Über den Stoffwechsel von Streptococcus citrovorus	27— 37
6. VASSEUR, E. & IMMERS, J., Genus specificity of the carbohydrate component in the sea-urchin egg jelly coat as revealed by paper chromatography	39— 41
7. OUCHTERLONY, Ö., Antigen-antibody reactions in gels. II. Factors determining the site of the precipitate	43— 48
8. v. EULER, H., HELLER, L. & CURMAN, C., Studies on the Freund-Kaminer reaction. I. Methods	49— 54
9. OUCHTERLONY, Ö., Antigen-antibody reactions in gels. III. The time factor .	55— 59
10. INGELMAN, B. & HALLING, M. S., Some physico-chemical experiments on fractions of dextran	61— 80
11. CLAEßSON, S., Molecular weight determinations by the isopiestic method . .	81— 85
12. v. EULER, H. & LINDEMAN G., Zur Biochemie der Tumorentwicklung und der Tumورهemmung	87— 97
13. STENHAGEN, E., Unsaturated higher carboxylic acids. The synthesis of $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic, $\Delta^{22:23}$ -tricosynoic, and $\Delta^{21:22}$ -tricosynoic acids	99—104
14. VASSEUR, E., Effect of calcium ions on the agglutination in Strongylocentrotus droebachiensis Müll.	105—116
15. EK, B., v. EULER, H. & HAHN, L., Zur Kenntnis tierischer Phosphatasen. V . .	117—127
16. MYRBÄCK, K. & JÄRNSTRÖM, T., Über die Schardingerdextrine. I	129—143
17. BARGONI, N., Acide pyruvique et réticulocytes dans le sang des rats normaux et cancéreux	145—151
18. STÄLLBERG-STENHAGEN, S., Optically active higher aliphatic compounds. IV .	153—160
19. MYRBÄCK, K., Über die Schardingerdextrine. II	161—177
20. ÅGREN, G., A micromethod for the microbiological determination of amino acids	179—185
21. STÄLLBERG-STENHAGEN, S., Optically active higher aliphatic compounds. V .	187—196
22. FREDGA, A. & BRÄNDSTRÖM, A., On the dimeric dithioderivatives of β -diketones	197—203
23. ROSÉN, B., Proteases in the digestive gland of Lamellibranchs	205—211
24. MAGNÉLI, A., The crystal structure of tetragonal potassium tungsten bronze .	213—221
25. —, Crystal structure studies on γ -tungsten oxide	223—230
26. SAMÉN, E., On the methyl methanetrissulfonate	231—233
27. MYRBÄCK, K., HAMMARSTRAND, M. & GELINDER, H., Über die aus Glucose durch Reversion gebildeten Saccharide	235—246
28. BARGONI, N., Influence de quelques facteurs sur la formation des réticulocytes	247—252
29. VASSEUR, E. & IMMERS, J., Hexosamine in the sea-urchin egg jelly coat: a misinterpretation of the method of ELSON and MORGAN	253—256
30. VON EULER, H. & HASSELQUIST, H., Oxydo-Reduktions-Reaktionen an Endiolen und an Dichlorphenol-Indophenol	257—261

31. VON EULER, H., Antagonistische und aktivierende Wirkungen von Ribonukleinsäure, Streptomycin, Co- und Mg-Ionen bei Samenkeimung und Blutbildung 263—268
32. MAGNÉLI, A., Crystal structure studies on tetragonal tungsten bronze 269—272
33. —, Notes on the analysis of tungsten bronzes 273—276
34. LUNDGREN, G. & SILLÉN, L. G., The crystal structure of $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. 277—292
35. VON EULER, H. & HELLER, L., Biochemische Wirkungen des Streptomycins und des Streptidins 293—298
36. VON EULER, H., HELLER, L. & CURMAN, C., Wirkungen der heterologen und homologen Normalseren auf fixierte Rattenleberzellen 299—305
37. V. EULER, H., HASSELQUIST, H. & LÖÖV, U., Über oxydative Spaltung der Stearinsäure in 2-basische Säuren und über Derivaten derselben 307—312
38. LEYON, H., Salting out adsorption of virus 313—317
39. WILLSTAEDT, H.† & REINART, A., Über Inhibitoren der Autoxydation von Milchfett 319—324
40. V. EULER, H. & HASSELQUIST, H., Zur Kenntnis der Reduktone. V 325—330
41. WILLSTAEDT, H.†, BORGGÅRD, M. & MYRBÄCK, K., Studien zur Chemotherapie der Tuberculose. V 331—336
42. SUNDBERG, I. & SILLÉN, L. G., On the crystal structure of $\text{K}_2\text{UO}_2\text{VO}_4$ (Synthetic anhydrous carnotite) 337—351
43. BROSET, C., On the structure of complex compounds of bivalent molybdenum. III. X-ray analysis of the structure of the chloroacid in alcoholic solution . 353—372
44. V. EULER, H., HELLER, L. & CURMAN, C., Zur Kenntnis der Karzinolyse. II . 373—383
45. PORATH, J., α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and β -methylterebic acid . . 385—392
46. VASSEUR, E., Effect of sea-urchin egg jelly-coat solution and calcium ions on the oxygen uptake of sea-urchin sperm 393—399
47. SVENSSON, H. & BRATTSTEN, I., An apparatus for continuous electrophoretic separation in flowing liquids 401—411
48. AROSENIUS, K. E., STÅLLBERG-STENHAGEN, S. & STENHAGEN, E., Branched long chain compounds. The synthesis of 20,20-dimethylheneicosanoic and 14,14-dimethylpentadecanoic acids 413—418
49. HULTIN, T., Agglutination of sea urchin eggs by nucleoproteins 419—423
50. V. EULER, H. & HELLER, L., Note on the 'Karyolytic effect' of certain rat sera 425—429
51. WANGEL, J., Om xanthogenhydrazider og xanthogenhydrazoner 431—445
52. HELLER, L. & BARGONI, N., Studien über die intrazelluläre Verteilung der Enzyme. III 447—454
53. MATELL, M., The optical antipodes of β -oxy- β -phenylpivalic acid and its methyl ester 455—461
54. AURIVILLIUS, B., Mixed bismuth oxides with layer lattices. I 463—480
55. BRÄNDSTRÖM, A., On the synthesis of esters of some organic acids 481—483
56. VON EULER, H., Aktivatoren und Inhibitoren der Entwicklung pflanzlicher und tierischer Zellen 485—492
57. SOAVE, F., Development of benzpyrene sarcoma and Jensen sarcoma grafted on rat brains and their influence on the pyruvic acid content of the blood 493—498
58. AURIVILLIUS, B., Mixed bismuth oxides with layer lattices. II. Structure of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$ 499—512
59. MAGNÉLI, A., Crystal structure studies on β -tungsten oxide 513—523
60. PORATH, J., The configuration at C_1 in (+)-camphor 525—531
61. LI, CHOH HAO & PEDERSEN, K. O., Preparation and properties of adrenocorticotropically active peptides (ACTH peptides) 533—539

62. VON EULER, B., VON EULER, H. & LINDEMAN, G., Über die Fortpflanzungs-
fähigkeit fettreich ernährter Ratten bei Eingabe von Wachstumsstoffen . . 541—554
63. VON EULER, H., HASSELQUIST, H. & LÖÖV, U., Ester der Reduktone. Zur
Kenntnis zweibasischer Säuren 555—564
64. GÜNTHER, G., ANDERSON, G. & PERLITZ, H., On the luminescence of phos-
phors of the aluminium oxide - calcium fluoride type activated with manga-
nese 565—572
65. WEIBULL, C., Ordered aggregation of salted out and dried bacterial flagella . 573—575



Wirkung der Malzamyaschen auf niedrigmolekulare Hydrolyseprodukte der Stärke

Von KARL MYRBÄCK und ESTHER SIHLBOM

Mit 5 Figuren im Text

Die unvollständige Verzuckerung der Stärke durch die gewöhnlichen Amylasen ist durch den Bau der Amylopektinmoleküle bedingt (1). Diese sind (im Gegensatz zu den Amylosemolekülen) keine einfachen Kettenmoleküle wie z. B. in der ursprünglichen Stärkeformel von HAWORTH, sondern enthalten neben den „normalen“ α -glucosidischen 1,4-Bindungen (Maltosebindungen) auch „anomale“ Glucosidbindungen in relativ kleiner Zahl, die von den gewöhnlichen Amylasen nicht oder nur äusserst langsam angegriffen werden. Die anomalen Glucosidbindungen (sowie gewisse andere Arten von „Anomalien“ wie Substitution durch Phosphorsäure) sind deshalb die Ursache zur Bildung der sog. Grenzdextrine; die Anomalien bleiben in den Grenzdextrinen und können dort, leichter als in der Stärke, nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass alle bisher untersuchte Grenzdextrinfraktionen 1,6- α -glucosidische Bindungen („Isomaltosebindungen“) enthalten (2). Es kann daraus berechnet werden, dass solche Bindungen in einer relativen Zahl von etwa 5 % in der Stärke vorhanden sind. Nach anderen Methoden konnte FREUDENBERG ebenfalls die Anwesenheit der 1,6-Bindungen zeigen (3). Ganz ausgeschlossen ist wohl nicht, dass auch noch andere Glucosidbindungen in ganz kleinen Mengen vorhanden sein könnten; gegenwärtig scheint indessen nur die Annahme notwendig, dass ausser den Maltosebindungen etwa 5 % Isomaltosebindungen vorkommen.

Die Amylasen greifen nicht nur die nativen, hochmolekularen Substrate (Stärke und Glykogen) an, sondern auch kurze Kettenmoleküle, die durch Maltosebindungen verknüpfte Glucosereste enthalten. Maltohexaose und Maltotetraose werden also gespalten und zwar im Falle der β -Amylase mit einer Geschwindigkeit, die nicht viel kleiner als die der Stärkespaltung ist. Für die Wirkung des Enzyms ist die Anwesenheit einer freien, reduzierenden Gruppe im Substrat nicht notwendig; die den erwähnten Sacchariden entsprechenden Karbonsäuren werden ebenfalls zerlegt. Dasselbe gilt für die α -Amylase (4).

Man stellt sich vor, dass die β -Amylase die Kettenmoleküle vom nicht reduzierenden Ende aus angreift und daraus Maltose freisetzt. Im Falle der Spaltung von Amylopektin und Glykogen ist deshalb die Maltose das einzige, niedrigmolekulare Spaltprodukt. Aus der Amylose muss, wenn darin ungeradzählige Ketten vorkommen, neben Maltose auch eine kleine Menge von Maltotriose entstehen. Dieser Zucker wird ebensowenig wie die Maltose von der β -Amylase angegriffen. Gewöhnliche Hefe (*S. cerevisiae*) vergärt Maltotriose (5).

Bezüglich der Wirkung der α -Amylase wurde auf Grund von Arbeiten aus diesem Laboratorium die folgende Arbeitshypothese aufgestellt. Das Enzym ist an der Anwesenheit freier Endgruppen, reduzierend oder nicht reduzierend, nicht gebunden; es ist eine Endo-amy lase. Es kann an sich jede α -glucosidische 1,4-Bindung im Inneren eines Kettenmoleküls spalten; jedoch stören Endgruppen und die sog. Anomalien, wie z. B. Verzweigungspunkte, die Wirkung des Enzyms in der Weise, dass eine gewisse Zahl von terminalen Bindungen bzw. Bindungen in nächster Nähe der Anomalien vor der Enzymwirkung mehr oder weniger geschützt ist, offenbar weil die Anlagerung des Enzyms in der zur Spaltung führenden Weise erschwert bzw. verhindert ist. So erklärt sich, dass Ketten, die mehr als eine bestimmte Zahl von Glucoseresten (wahrscheinlich etwa 8) enthalten, viel schneller gespalten werden als kürzere Ketten. Dem entspricht, dass die Affinität des Enzyms zu langen Ketten eine viel höhere ist als die Affinität zu Sacchariden mit weniger als etwa 8 Glucoseresten (6).

Für die Aufklärung der Wirkungsweise der Amy lasen ist wünschenswert, ihr Verhalten zu niedrigmolekularen Substraten bekannter Konstitution untersuchen zu können. Dazu würde man teils Substrate von Typus der Maltotetraose usw. nötig haben, also Substrate, die nur Maltosebindungen enthalten, teils auch Substrate mit verzweigten Ketten bzw. Ketten, die überhaupt irgend eine Anomalie enthalten. Für die Darstellung dieser Substrate kommen synthetische Methoden gar nicht in Frage, sondern man ist auf die Isolierung von Abbauprodukten der Stärke, deren Komponenten bzw. Abbauprodukte des Glykogens angewiesen. Die Darstellung einheitlicher Substanzen aus den mit Säuren oder Enzymen erhältlichen Mischungen von sehr vielen Sacchariden ist aber eine schwer zu lösende Aufgabe.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung der Malzamy lasen auf gewisse durch Säurehydrolyse von Stärke erhaltenen Produkte untersucht (7): 2 kg Majsstärke wurden in 10 Litern 0,2 n Schwefelsäure 60 Minuten gekocht. Die mit BaCO_3 neutralisierte und filtrierte Lösung wurde zur Entfernung von leicht vergärbaren Zuckern mit Presshefe behandelt und die Hefe nach Abschluss der Gärung wieder entfernt. Das Filtrat wurde zum dünnen Sirup eingengt, und dann mit $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol versetzt. Der klebrige Niederschlag von höhermolekularen Produkten wurde mit etwas 70 % Alkohol geknetet, wonach Filtrat plus Waschwasser wieder zum dünnen Sirup eingengt wurden. Mit steigenden Mengen von Alkohol wurden daraus nacheinander die Fraktionen I–IV erhalten (Tabelle 1). Das Filtrat wurde wieder zum Sirup eingengt und daraus mit Alkohol die Fraktionen V–IX gewonnen.

Die vergärbaren Anteile der Fraktionen enthalten keine Glucose oder Maltose, wie z. B. aus der Abbildung 1 hervorgeht. In dieser Abbildung sind einige Versuche mit der Fraktion VI zusammengefasst. Je 200 mg des Dextrins wurden in 2 ml Wasser mit Presshefe vergoren, wobei in einigen Versuchen Glucose und/oder Maltose noch in bekannten Mengen zugesetzt wurden. Aus der Abbildung 1 findet man, dass die Gärgeschwindigkeiten die folgenden sind:

Für Glucose	etwa 45 ml CO_2 /Stunde
» Maltose	11 » » »
» Dextrin VI	< 3 » » »

Unmöglich ist nicht, dass der vergärbare Teil der Fraktion VI Maltotriose enthält. Dieser Zucker ist durch Presshefe vergärbar; die Geschwindigkeit variiert aber nach unserer Erfahrung von Hefeprobe zu Hefeprobe recht stark, ist aber im allgemeinen wesentlich kleiner als die der Maltose. Aus älteren Versuchen scheint aber

Tabelle 1

Fraktion	Ausbeute in % von der Stärke	Mittleres Mol.gew.	% vergärbar	$[\alpha]_{\text{Hg}}$
I	7,0	880	12	+179°
II	2,5	850	12	179°
III	1,9	860	15	—
IV	0,7	765	15	—
V	2,4	640	25	170°
VI	0,5	620	28	—
VII	0,2	640	35	—
VIII	2,7	540	45	156°
IX	0,1	540	45	—

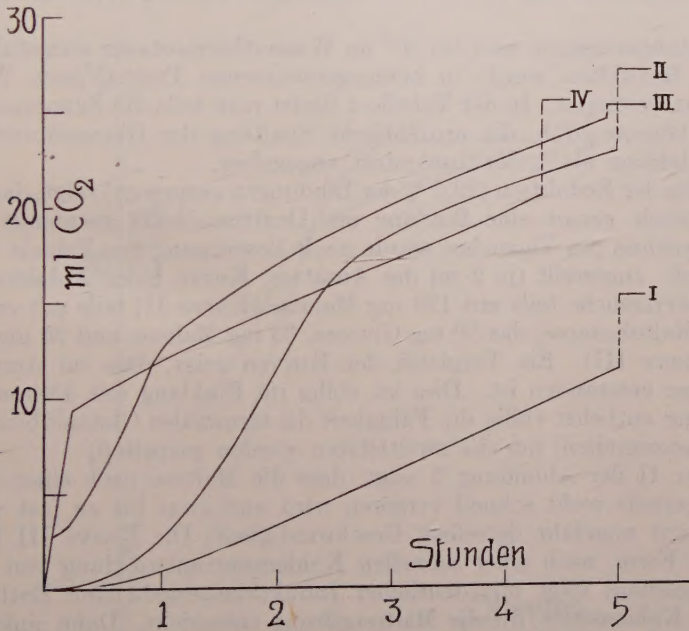


Fig. 1.

Kurve	I: 200 mg Dextrin			
»	II: 200 » »	+ 62 mg Maltose		
»	III: 200 » »	+ 29 » »	+ 15 mg Glucose	
»	IV: 200 » »	—	+ 48 » »	

hervorzugehen, dass auch Trisaccharide, die je eine Maltose- und eine Isomaltosebindung enthalten, langsam vergoren werden. Die Isomaltose (6- α -Glucosido-glucose) vergärt ebenfalls langsam.

Zu den folgenden Versuchen über die enzymatische Spaltung wurde die Dextrinfraktion I angewendet. 100 mg Trockensubstanz reduzierten wie 18,65 mg Glucose.

Nach vollständiger Hydrolyse von 100 mg wurden 98,5 mg Glucose gefunden. Dass dieser Wert niedriger als der Theoretische ist, hängt damit zusammen, dass die Dextrinfraktionen kleine Mengen von Salzen enthalten. Die mittlere Kettenlänge der Fraktion I ist $98,5/18,65 = 5,3$. Da die folgenden Fraktionen (Tabelle 1) fast dasselbe Molekulargewicht zeigen wie die Fraktion I, dürfte angenommen werden können, dass diese nicht allzu uneinheitlich ist sondern hauptsächlich Penta- und Hexasaccharide enthält.

Versuche mit β -Amylase

Die Enzymlösungen wurden durch Extraktion von Gerste hergestellt und in üblicher Weise von α -Amylase befreit.

Versuchsmischung. 5 g Substrat, 4,95 g Glucose bzw. Maltosehydrat entsprechend¹, 5 ml Phosphatpuffer, pH = 5,3, 40 ml Wasser, 5 ml β -Amylaselösung (Toluol). Volumen 53 ml, d. h. bei vollständiger Spaltung 93,4 mg Maltosehydrat pro ml.

Alle Spaltungsversuche sind bei 30° im Wasserthermostaten ausgeführt. Die Zunahme der Reduktion wurde in herausgenommenen Proben nach WILLSTÄTER und SCHUDEL bestimmt. In der Tabelle 2 findet man teils die Zunahme der Reduktion als % Glucose, d. h. die prozentische Spaltung der Glucosidbindungen, teils die Totalreduktion als % Maltosehydrat angegeben.

Der Anstieg der Reduktion (22,6 % der Bindungen gesprengt) zeigt, dass im Durchschnitt ziemlich genau eine Bindung pro Dextrinmolekül gesprengt worden ist.

Nach Abschluss des Versuches wurde nach Beseitigung des Toluols Gärversuche mit Presshefe angestellt (je 2 ml des Ansatzes, Kurve I der Abbildung 2). Zum Vergleich Gärversuche teils mit 120 mg Maltose (Kurve II) teils mit einem Hydrolysat einer Maltohexaose, das 50 mg Glucose, 35 mg Maltose und 25 mg Maltotriose enthielt (Kurve III). Ein Vergleich der Kurven zeigt, dass im Amylaseversuch keine Glucose entstanden ist. Dies ist völlig im Einklang mit älteren Versuchen; die β -Amylase entbehrt völlig die Fähigkeit die terminalen Glucosidbindungen eines Saccharids anzugreifen; nur die zweitletzten werden gespalten.

Die Kurve II der Abbildung 2 zeigt, dass die Maltose nach einer anfänglichen Induktionsperiode recht schnell vergoren wird und zwar bis zu fast vollständiger Vergärung mit ungefähr derselben Geschwindigkeit. Die Kurve III hat dagegen eine andere Form; nach einer schnellen Kohlensäureentwicklung von etwa 10 ml (Glucosevergärung) folgt mit deutlicher Induktionsperiode eine Entbindung von etwa 11 ml Kohlensäure, die die Maltosegärung entspricht. Dann sinkt die Gärgeschwindigkeit wieder, und die restlichen 6 ml Kohlensäure sind einer Vergärung von Maltotriose zuzuschreiben. Die Gärkurve I des mit β -Amylase erhaltenen Hydrolysat zeigt ebenfalls, nach einer Kohlensäureentwicklung von 24 ml, ein Absinken der Gärgeschwindigkeit: Etwa 7 ml werden langsam entwickelt, was wahrscheinlich so zu deuten ist, dass auch hier Maltotriose anwesend ist. Andererseits ist die Form der Kurve nicht so ausgeprägt, in anderen Worten die Gärgeschwindigkeit der Maltotriose nicht so viel kleiner als die der Maltose, dass die Menge der Maltotriose aus der Kurve berechnet werden kann. Andere Tatsachen lassen aber eine approximative Berechnung zu.

¹ Sämtliche Gewichtsangaben sind als Glucose (Maltosehydrat, Maltotriose + 2 H₂O etc.) angegeben, was alle Berechnungen wesentlich erleichtert.

Tabelle 2

Zeit	% Spaltung	% „Maltosehydrat“
0	0	35,8
2 Min.	0,9	37,1
5 »	1,5	38,2
15 »	4,2	42,6
47 »	9,4	51,2
17 Stunden	20,1	68,5
42 »	20,8	69,8
90 »	21,0	70,0
210 »	22,6	72,5

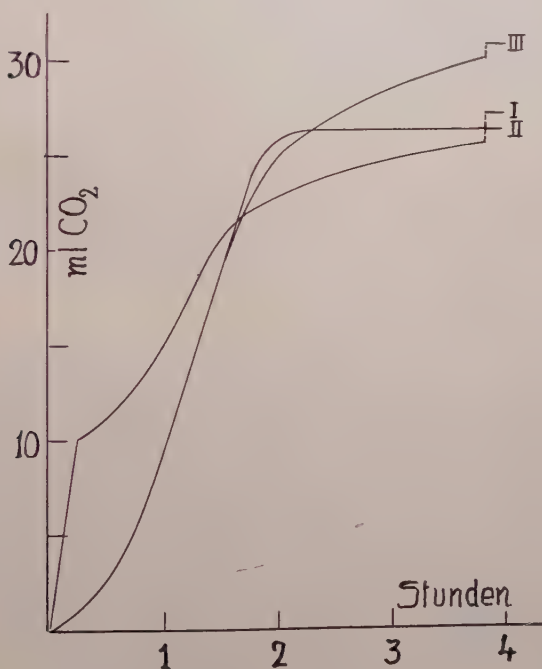


Fig. 2.

Kurve I: Mit β -Amylase erhaltenes Hydrolysat.

» II: 120 mg Maltose

» III: 50 mg Glucose + 35 mg Maltose + 25 mg Maltotriose.

Die totale Kohlensäureentwicklung im Versuch 1, 31 ml, bedeutet, dass 137 mg Zucker (als Maltosehydrat berechnet) vergoren worden sind. Dies ergibt, auf den ganzen Versuchsansatz umgerechnet, 3,63 g oder 73,8 %. Der Reduktionswert entsprach nach der Tabelle 2 72,5 %.

40 ml des Hydrolysats wurden mit Presshefe vergoren, filtriert, eingeengt und auf 25 ml gebracht. 1 ml dieser Lösung enthielt nach vollständiger Hydrolyse mit Schwefelsäure 39,0 mg Glucose; im ganzen Versuchsansatz also 1,30 g. Da der vergorene Teil 3,63 g betrug, so stimmt die Summe, 4,93 g, sehr gut mit der in Arbeit genommenen Dextrinmenge. (In anderen Fällen, besonders wenn hochmolekulare Dextrine anwesend sind, ist die Übereinstimmung weniger gut). Vor der Säurehydrolyse entsprach die Reduktion der vergorenen Lösung einem Gehalt von 7,65 mg Glucose/ml; auf die ursprüngliche Menge umgerechnet also 0,253 g oder 0,506 g Maltosehydrat. Da die Reduktion der mit β -Amylase behandelten Lösung 3,57 g Maltosehydrat entsprach, so ist durch die Gärung Zucker beseitigt worden, dessen Reduktionswert $3,57 - 0,51 = 3,06$ g Maltosehydrat entspricht. Andererseits liess sich aus der Kohlensäureentwicklung im Gärversuch berechnen, dass 3,63 g Zucker vergoren worden sind. Da also die tatsächlich vergorene Zuckermenge sogar grösser ist als die scheinbare, aus der Totalreduktion der Lösung berechnete Maltosemenge im Hydrolysat, so folgt, dass der vergorene Zucker nicht ausschliesslich Maltose sein kann. Da auch keine Glucose anwesend war und ausser Maltose nur Maltotriose als relativ schnell vergärender Zucker infragekommt, so kann die wirkliche Maltosemenge x folgendermassen berechnet werden:

$$x + \frac{3,63 - x}{3} = \frac{3,06}{2}$$

Man findet also die Maltosemenge 1,92 g. Das durch die β -Amylase aus der Dextrinfraction I erzeugte Reaktionsgemisch sollte also folgende Zusammensetzung haben

38,9 %	Maltose
34,6 %	Maltotriose
26,5 %	nicht vergärbare Saccharide (Grenz-dextrine).

Sehr genau sind selbstverständlich die Werte für Maltose bzw. Maltotriose nicht.

In dem Ausgangsmaterial, der Dextrinfraction I, kommen unter allen Umständen Pentasaccharide in grossen Mengen vor, und zwar müssen dabei die in der Abbildung 3 mit 1-11 bezeichneten Molekülarten in Betracht gezogen werden. In den Formeln bedeutet der Pfeil ein Glucoserest; die Pfeilspitze ist die reduzierende Gruppe. Die 1,4- α -glucosidische Bindung (Maltosebindung) wird durch die Kombination Pfeilspitze-Pfeilende veranschaulicht; die 1,6-Bindung (Isomaltosebindung) durch die Kombination Pfeilspitze-Pfeilmitte. Ausser den abgebildeten 11 Molekülarten sind auch solche mit mehreren Isomaltosebindungen theoretisch denkbar; ihre Menge muss aber auf alle Fälle ausserordentlich klein sein.

Die Stärke enthält etwa 4,5 % Isomaltosebindungen. Da diese durch Säure langsamer hydrolysiert werden als die Maltosebindungen, so ist anzunehmen, dass erstere in den Dextrinfractionen etwas angereichert sein müssen. Wir nehmen zunächst vereinfachend an, dass die Dextrinfraction I nur Pentasaccharide enthält, und dass darin 6 % Isomaltosebindungen vorkommen. In 4 125 Pentasaccharidmolekülen mit 20 625 Glucoseresten und 16 500 Glucosidbindungen sind dann 990 Isomaltosebindungen vorhanden, d. h. das Substrat enthält 3 135 *normale* Pentasaccharidmoleküle der Formel 1 und 990 *anomale* Pentasaccharidmoleküle der Formeln 2-11. Da wir von der Grundannahme ausgehen, dass die Isomaltosebindungen in der Stärke völlig unregelmässig verteilt sind, so ist wahrscheinlich, dass jede der Formeln 2-11

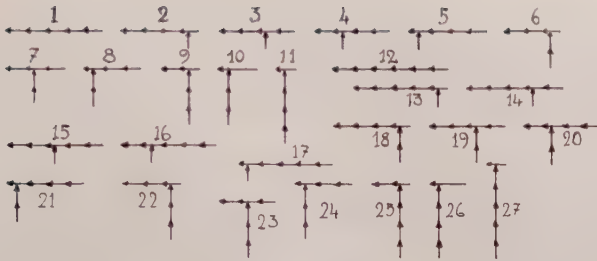


Fig. 3.

Schematische Formel der Substrate.

etwa dieselbe Zahl, 99, von Sacchariden repräsentiert. Bei der Spaltung eines Substrates dieser Art mit β -Amylase entstehen aus den normalen Sacchariden (Formel 1) 3 135 Moleküle Maltose und ebensoviele Moleküle Maltotriose. Aus Sacchariden der Formeln 4, 5, 8, 9, 10 und 11 wird je ein Molekül Maltose abgespalten oder insgesamt 594 Moleküle. Die totale Ausbeute an Maltose sollte also $3\,135 + 594 = 3\,729$ oder 36,2 % sein. Die Ausbeute an Maltotriose (3 135 Moleküle) ist dann 45,6 %. Die Ausbeute an Grenzdextrinen findet man als Differenz, oder man berechnet sie folgendermassen: Dextrine der Formeln 2, 3, 6 und 7 werden nicht angegriffen; aus 4, 5, 8, 9, 10 und 11 entstehen Trisaccharide. Ausbeute $4 \times 5 \times 99 + 6 \times 3 \times 99 = 3\,762$ Glucosereste oder 18,2 %. Nimmt man an, dass die untersuchte Dextrinfraktion anstatt 6 % Isomaltosebindungen 8 bzw. 10 % enthält, so ergeben sich andere Werte der Ausbeuten (Tabelle 3).

Tabelle 3

Zusammensetzung	Nur Pentasaccharide			3 Hexasaccharide auf 7 Pentasaccharide	Gefunden
	6	8	10	8	
% Isomaltosebindungen					—
Maltose	36,2	34,9	33,6	47,6	38,9
Maltotriose	45,6	40,8	36,0	26,9	34,6
Grenzdextrin	18,2	24,3	30,4	25,4	25,5

Nun war ja die mittlere Kettenlänge der Substratmoleküle 5,3. Es wird also ausser Pentasacchariden jedenfalls auch Hexasaccharide anwesend sein und zwar auf 7 Moleküle Pentasaccharid etwa 3 Moleküle Hexasaccharid. Ausser den erwähnten Typen von Sacchariden (Formel 1–11) müssen auch solche der Formeln 12–27 anwesend sein, und zwar entsprechen von 10 000 Dextrinmolekülen 4 760 der Formel 1, je 224 den Formeln 2–11, 1 800 der Formel 12 und je 80 den Formeln 13–27. Nehmen wir an, dass im Präparat 8 % Isomaltosebindungen vorhanden waren, so lassen sich die Ausbeuten an den verschiedenen Spaltprodukten beim Abbau mit β -Amylase wie oben berechnen (Tabelle 3).

Wenn man beachtet, dass erstens die gefundenen Werte der Maltose und der Maltotriose nicht sehr genau sein können, und zweitens dass das Substrat ausser Penta- und Hexasacchariden sicher kleinere Mengen von anderen Sacchariden enthalten dürfte, so stützen die Versuche doch die folgende Auffassung vom Wesen der β -Amylasewirkung:

- 1) Das Enzym spaltet aus Ketten mit lauter Maltosebindungen nur Maltose ab.
- 2) Ist die Kette normal gebaut und enthält sie eine ungerade Zahl von Glucose-resten, so entsteht pro Mol neben Maltose auch ein Mol Maltotriose (Formel 1).
- 3) Die Isomaltosebindungen verhindern die weitere Wirkung des Enzyms.
- 4) Die Spaltung geschieht vom nicht reduzierenden Ende aus; deshalb wird aus Molekülen der Formeln 2, 3, 6, 13, 14, 18 und 19 überhaupt keine Maltose gebildet.
- 5) Die Spaltung hört an oder kurz vor einem Verzweigungspunkt (Isomaltosebindung) auf. Aus den Molekülen 4, 5, 8, 15, 16, 20 und 21 wird aus der „Hauptkette“ je ein Mol Maltose abgespalten; aus den Molekülen 9, 10, 11, 22, 23, 25 und 26 je ein Mol Maltose aus der „Seitenkette“. Das Molekül 24 gibt sowohl aus Hauptkette wie aus Seitenkette je ein Mol Maltose. Im Falle von 17 werden zwei Moleküle Maltose aus der Hauptkette freigesetzt und im Falle von 27 zwei Moleküle aus der Seitenkette.

Versuche mit α -Amylase

Die angewendete Enzymlösung wurde zunächst in einem Versuch mit Stärke geprüft (Tabelle 4): 50 ml 2 % Stärkelösung, 3 ml α -Amylaselösung, 5 ml Phosphatpuffer pH = 5,3, Wasser zu 100 ml.

Die Spaltung wird durch die Kurve I der Abbildung 4 veranschaulicht. Sie hat die für die α -Malzamyase charakteristische Form, die wir früher beschrieben haben: Etwa 17 % der Glucosidbindungen der Stärke werden mit einer viel grösseren Geschwindigkeit gesprengt als die übrigen. Die Geschwindigkeit der initialen Periode („Dextrinierung“) ist im obigen Versuch > 10,2 % der Bindungen pro Minute oder pro ml Enzymlösung > 3,4 %/Minute. Dieselbe Enzymlösung wurde weiter in Versuchen mit dem oben erwähnten Dextrinpräparat angewendet.

4,72 g Dextrin (Trockengew.) wurden mit 5 ml Phosphatpuffer von pH = 5,3, 5 ml α -Amylaselösung und Wasser auf 50 ml gebracht. Spaltung bei 30° unter Toluol. Reduktionsbestimmungen nach verschiedenen Zeiten; daraus wurde der scheinbare Gehalt an Maltose berechnet. Aus der Zunahme der Reduktion wurde weiter die prozentische Zahl gesprengter Glucosidbindungen ermittelt (Tabelle 5).

Tabelle 4

Zeit	% Spaltung	Zeit	% Spaltung
0,5 Min.	5,1	70 Min.	22,4
2 »	10,3	350 »	31,3
4 »	14,5	20 Stunden	37,8
6 »	15,8	47 »	39,8
8 »	16,2	120 »	43,4
11 »	16,2	168 »	44,2
20 »	17,8	216 »	45,9
30 »	19,3	312 »	48,5

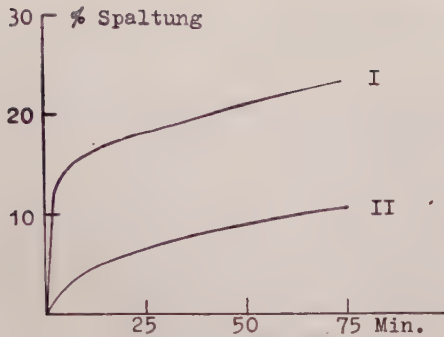


Fig. 4.

Kurve I: Spaltung der Stärke durch α -Malzamylase
 II: Spaltung der Dextrinfraktion durch dieselbe Enzymmenge.

Tabelle 5

Zeit	% Spaltung	% „Maltose“	Gärungsversuche	
			% Glucose	% „Maltose“
0	0	38,9	—	—
1 Min.	0,2	39,2	—	—
3 »	1,2	40,8	—	—
5 »	2,5	42,8	—	—
10 »	4,5	46,2	—	—
20 »	6,0	48,6	—	—
35 »	7,8	51,2	—	—
45 »	—	—	3	26
50 »	8,8	53,0	—	—
75 »	10,6	55,4	—	—
85 »	—	—	3	30
175 »	15,8	64,5	4	39
305 »	19,6	70,7	5	48
24 Stunden	30,8	89,0	10	64
72 »	35,5	96,5	10	64

Der Versuch wird durch die Kurve II der Abbildung 4 veranschaulicht. Die Anfangsgeschwindigkeit ist 0,5 % der Bindungen pro Minute oder pro ml Enzymlösung 0,1 %/Min. Die schnell spaltbaren Bindungen *in der Stärke* werden also mit einer Geschwindigkeit gesprengt, die mindestens 34 mal grösser ist als die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung des Dextrinpräparates durch dasselbe Enzympräparat. Dies entspricht früheren Befunden (6), nach welchen die Affinität des Enzyms zu langen Ketten eine viel grössere ist als zu Ketten kürzer als eine gewisse Zahl von Glucoseresten, die nicht weit von 8 liegen dürfte.

Rechnet man die Reduktionswerte der Versuchsmischungen in Maltose um (und dies wird in vielen Arbeiten über Amylasen getan), so findet man, dass die „Maltoseausbeute“ oft 100 % übersteigt. Die Gärungsversuche zeigen aber, wie auch in früheren Arbeiten aus diesem Laboratorium gezeigt wurde, dass bei der Spaltung

mit α -Malzamyrase nicht nur Maltose sondern auch Glucose entsteht. Der höhere Reduktionswert der Glucose kompensiert den niedrigeren der zugleich entstehenden Grenzdextrine.

Die Zunahme der Reduktionswerte während der Spaltung mit α -Amylase zeigt, dass im Substrat durchschnittlich etwa 1,5 Glucosidbindungen pro Dextrinmolekül gespalten worden ist.

Nach Abschluss des Spaltungsversuches wurde ein Teil des Ansatzes nach Entfernung des Toluols mit Presshefe vergoren. Nach Aufhören der Gärung wurde die Hefe abfiltriert und das Filtrat stark eingengt. Zuckerbestimmung nach vollständiger Hydrolyse mit Schwefelsäure zeigte, dass die unvergärbaren Stoffe (Grenzdextrine) einer Glucosemenge von 1,087 g oder 23,3 % vom Substrat entsprechen. Die Reduktion der Grenzdextrine vor der Säurehydrolyse (= 0,271 g Glucose) zeigte, dass sie eine mittlere Kettenlänge von 4,0 Einheiten besaßen.

Die Reduktion der Versuchsmischung vor der Gärung entsprach 4,50 g Maltosehydrat, dieselbe nach der Gärung 0,54 g. Die Abnahme der Reduktion durch die Gärung entspricht also einer Menge von 3,96 g Maltosehydrat. Der Gärversuch zeigt aber, dass in der Tat 0,51 g Glucose und 2,98 g Maltose (+ Maltotriose) vergoren worden sind. Der durch die Gärung verschwundene Zucker reduziert also wie $1,02 + 2,98 = 4,00$ g (unter Voraussetzung, dass keine Maltotriose anwesend ist). Da die tatsächlich vergorene Zuckermenge 3,96 g betrug, so scheint hervorzugehen, dass höchstens sehr kleine Mengen von Maltotriose gebildet worden sind; die vergärbaren Zucker scheinen ganz fast aus Glucose und Maltose zu bestehen.

Ein zweiter Versuch mit einem anderen α -Amylasepräparat und der Dextrinfraktion I wurde mit doppeltem Ansatz ausgeführt. Tabelle 6.

Tabelle 6

Zeit	% Spaltung der Bindungen	% „Maltose“	Gärungsversuche	
			% Glucose	% „Maltose“
0	0	39,9	—	—
0,5 Min.	0,4	40,4	—	—
5 »	1,2	41,8	—	—
15 »	2,3	43,7	—	—
2,5 Stunden	6,6	50,7	—	—
7 »	11,2	58,2	—	—
24 »	20,6	73,5	5	39
49 »	27,3	84,1	—	—
72 »	28,1	85,5	8	59
216 »	34,5	96,0	—	—
240 »	35,5	97,6	10	61
360 »	37,1	100,1	13	61
912 »	40,2	105,0	—	—

Auch in diesem Fall geht die Spaltung, wenn auch langsam, sehr lange weiter, so dass allmählich eine scheinbare Maltoseausbeute von mehr als 100 % erhalten wird. Die Gärversuche zeigen aber, dass die wirkliche Maltoseausbeute nur etwa 60 % ist. Neben der Maltose werden Glucose und Grenzdextrine gebildet. Nach

240 Stunden wurden 25 ml des Versuchsansatzes mit Presshefe vergoren und das Filtrat untersucht. Die Reduktion der nicht vergärbaren Saccharide entsprach 0,452 g Maltosehydrat. Die scheinbare Maltosemenge vor der Gärung war dagegen 2,270 g. Vergoren wurde also eine Zuckermenge, die 1,818 g Maltosehydrat entspricht. Nach den Gärproben waren aber 0,225 g Glucose und 1,425 g Maltose (+ Maltotriose) vorhanden. Die Reduktion dieser Zucker entspricht einer Menge von 1,975 g Maltosehydrat, während die direkt gemessenen Abnahme der Reduktion 1,818 g Maltosehydrat entspricht. Hieraus berechnet sich, dass das Hydrolysat neben Glucose 1,254 g Maltose und 0,171 g Maltotriose enthielt. Die Genauigkeit dieser Werte ist nicht gross; jedenfalls scheint hervorzugehen, dass die Maltotriosemenge nur klein ist.

Nach einer Spaltungszeit von 360 Stunden wurde ein ähnlicher Gärversuch durchgeführt. Auf die ursprüngliche Reaktionsmischung umgerechnet, fanden wir, dass 5,70 g Maltose (- Maltotriose) und 1,25 g Glucose vergoren wurden. Die Verminderung der Reduktion während der Gärung entsprach 8,14 g Maltose. Die Verminderung der Reduktion, die von Maltose (und Maltotriose) herrührt, ist also $8,14 - 2 \times 1,25 = 5,64$ g. Vergleichen wir die Zahlen 5,70 und 5,64, so kann geschlossen werden, dass keine nennenswerten Mengen von Maltotriose anwesend sein können.

Ähnliche Versuche wurden mit der Dextrinfraktion II angestellt. Das mittlere Molekulargewicht des Substrates war 846.

Spaltung mit β -Amylase

Versuchsordnung wie oben. Tabelle 7.

Tabelle 7

Zeit	% Spaltung	% „Maltose“	Zeit	% Spaltung	% „Maltose“
0	0	37,0	60 Min.	20,5	69,9
5 Min.	5,6	46,0	120 »	21,9	72,2
10 »	8,6	50,8	390 »	21,2	71,0
20 »	13,3	58,3	27 Stunden	21,2	71,0
30 »	17,2	64,6			

Der Versuch verlief also genau so wie der entsprechende Versuch mit der Dextrinfraktion I. Nach Abschluss der Spaltung wurden 20 ml des Hydrolysats, 2,02 g Glucose entsprechend, mit Presshefe vergoren. Aus dem Verlauf der Kohlensäureentwicklung geht hervor, erstens dass keine Glucose entstanden ist, zweitens dass insgesamt 1,560 g Zucker vergoren worden sind. Die Menge der Grenzdextrine ist also 0,46 g oder 22,8 %. Reduktionsbestimmung vor und nach der Gärung zeigte, dass eine Abnahme der Reduktion eingetreten war, die 1,265 g Maltosehydrat entsprach. Daraus berechnet sich wie oben angegeben, dass in der Tat 0,675 g (33,4 %) Maltose und 0,885 g (43,8 %) Maltotriose entstanden waren. Dies Ergebnis ist dem

mit der Fraktion I gewonnenen sehr ähnlich. Die Ausbeute an Maltotriose ist etwas höher, was damit im Einklang ist, dass das mittlere Molekulargewicht des Substrates etwas niedriger und demnach der Gehalt an Pentasacchariden etwas höher war.

Spaltung mit α -Amylase

Versuch wie oben. Die Dextrinmenge entspricht 10,19 g Glucose. In der Tabelle 8 Mittel aus zwei Parallelversuchen.

Tabelle 8

Zeit	% Spaltung	% „Maltose“	Gärungsversuche	
			% Glucose	% „Maltose“
0	0	37,6	—	—
10 Min.	2,2	41,2	—	—
15 »	3,2	42,7	—	—
20 »	3,9	43,7	—	—
25 »	4,0	44,0	2	18
30 »	4,2	44,3	2	24
35 »	5,1	45,7	—	—
40 »	5,7	46,7	—	—
45 »	5,9	47,0	—	—
50 »	6,4	47,7	—	—
60 »	6,9	48,6	—	—
90 »	7,8	50,2	2	26
110 »	9,2	52,5	—	—
130 »	9,3	52,6	—	—
150 »	10,2	54,0	—	—
185 »	12,0	57,4	—	—
21,5 Stunden	24,1	76,4	—	—
43 »	29,6	85,2	—	—
66 »	32,3	89,5	—	—
89 »	32,3	89,5	15	65

Sowohl aus diesem Versuch wie aus den oben angeführten (Tabelle 5 und 6) geht hervor, dass zunächst etwa 6 % der Glucosidbindungen relativ schnell gelöst werden. Gleichzeitig entstehen vergärbare Zucker, nämlich 2–3 % Glucose und etwa 25 % Maltose. Dies etwas überraschende Ergebnis dürfte folgendermassen zu deuten sein. Die α -Malzamyase spaltet nach der von uns mehrmals ausgesprochenen Auffassung normale Maltosebindungen im Inneren von Kettenmolekülen und zwar so, dass Bindungen weit von Endgruppen bzw. Anomalien verhältnismässig schnell angegriffen werden, dagegen terminale Bindungen und Bindungen in der Nähe der Anomalien träge oder gar nicht. Wenn wir also in den hier beschriebenen Versuchen im Wesentlichen mit einem Gemisch von Hexa- und Pentasacchariden zu tun haben, so ist wahrscheinlich, dass die *normalen Hexasaccharide* zunächst angegriffen werden, wobei Maltose und/oder Maltotriose nebst kleinen Mengen von Glucose entstehen; die Totalmenge der vergärbaren Zuckern sollte auf alle Fälle gleich der Menge der normal gebauten Hexasaccharide sein. Da der Gehalt an Hexasacchariden etwa

30 % betragen dürfte, wovon etwa 75 % *normal* gebaut sein dürften, so sollten, wenn man annimmt, dass das normale Hexasaccharid in zwei Moleküle Maltotriose zerlegt wird, etwa $30 \times 1/5 \times 3.4 = 4.5$ % der Bindungen des Substrats schnell zerlegt werden. Nimmt man dagegen an, dass das Hexasaccharid mit grosser Geschwindigkeit in je drei Moleküle Maltose zerlegt wird, so müsste die Zahl der schnell spaltbaren Bindungen etwa doppelt so gross sein. Die Pentasaccharide werden, vermutlich mit einer wesentlich kleineren Geschwindigkeit in Maltose + Maltotriose zerlegt. Insgesamt sollte aus normalen Sacchariden so viel vergärbare Zucker entstehen, als etwa 70 % der totalen Substratmenge entspricht. Ausserdem dürfte wie im Falle der β -Amylase Zucker auch aus den anomal gebauten Sacchariden entstehen, so dass die totale Ausbeute 80 % übersteigen sollte. Dies ist auch, wie aus den Tabellen 8 und 9 hervorgeht, der Fall. Möglich wäre sogar, dass die α -Amylase aus einer die reduzierende Gruppe tragenden Kette eines verzweigten Dextrins Maltose oder Glucose abspalten kann.

Nach einer Spaltungszeit von 90 Minuten wurden 20 ml des Versuchsansatzes, 2.02 g Glucose entsprechend, mit Presshefe vergoren, bis die Kohlensäureentwicklung ganz aufhörte. Der Gärversuch zeigte, dass 0.570 g Zucker (davon 0.050 g Glucose) vergoren worden waren. Der unvergorene Rest sollte also 1.450 g betragen. Durch Hydrolyse mit Schwefelsäure fanden wir 1.391 g. Der Verlust dürfte damit zusammenhängen, dass die Hefe unvergärbare Saccharide irgendwie verbrauchen oder adsorptiv zurückhalten kann. Der unvergorene Rest reduzierte vor der Hydrolyse wie 0.236 g Glucose. Durch die Gärung ist dann eine Zuckermenge verschwunden, deren Reduktion 0.236 g Glucose entspricht. Von der vergorenen Zuckermenge waren aber in der Tat nur 0.050 g Glucose; der Rest, 0.222 g Glucose entsprechend, ist Maltose und/oder Maltotriose. Diese Menge entspricht 0.444 g Maltosehydrat; aus der Kohlensäureentwicklung berechneten wir aber dass 0.520 g vergoren worden waren. Wie oben kann dann der Gehalt der Versuchslösung an Maltose und Maltotriose approximativ berechnet werden. Man findet die folgende Zusammensetzung:

Glucose	2,5 %
Maltose	14,5 %
Maltotriose	11,2 %
Dextrine	71,8 %

Oben wurde gezeigt, dass bei der Spaltung mit α -Amylase nach sehr langen Versuchszeiten neben Grenzdextrinen nur oder fast nur Maltose und Glucose vorhanden sind. Daraus müsste man schliessen, entweder dass bei der Spaltung überhaupt keine Maltotriose entsteht, oder dass zunächst entstehende Maltotriose durch das Enzym allmählich zerlegt wird. In dem hier angeführten Versuch wurde nach einer verhältnismässig sehr kurzen Versuchsdauer erhebliche Mengen des Trisaccharids gefunden. Es scheint also hervorzugehen, dass bei der Spaltung mit α -Malzamyase zunächst u. a. Maltotriose entsteht, dass der Zucker aber dann allmählich in Maltose und Glucose zerlegt wird.

Bei Versuchen mit α -Malzamyase fällt auf, dass die Spaltung mit abnehmender Geschwindigkeit sehr lange anhält, so dass in mässigen Versuchszeiten keine wirkliche Verzuckerungsgrenze erreicht wird. Dies findet man nicht nur bei der Spaltung der Stärke, sondern es geht auch aus den obigen Versuchen mit niedrigmolekularen Substraten hervor.

Eine für das ganze Problem der Amylasewirkung sehr wichtige Frage ist dabei, ob die beobachtete langsame „Nachverzuckerung“ wirklich eine Wirkung der α -Amylase ist oder aber ob in den Malzextrakten usw. vielleicht Glucosidasen anderer Art vorhanden sein können, die eine Spaltung der von den eigentlichen Amylasen erzeugten, niedrigmolekularen Dextrinen bewirken können. Wir haben diese Frage dadurch zu beantworten versucht, dass wir mit der oben erwähnten Dextrinfraktion II Parallelversuche angestellt haben, teils mit einer rohen α -Amylaselösung, d. h. einem nach E. OHLSON von der β -Amylase befreiten Malzextrakt, teils mit einem von O. HOLMBERGH dargestellten, hochgereinigten Präparat. Der Reinheitsgrad dieses Präparates war fast 100 mal grösser als die des Rohpräparates. Die Versuche wurden wie oben angestellt. In Versuch 1 15 ml erhitzter Maltzextrakt, etwa 0,4 g Trockengewicht entsprechend. Zum Versuch 2 wurden 0,2 ml der gereinigten Lösung mit 23 ml Wasser verdünnt und zur Inaktivierung etwa noch vorhandener Spuren von β -Amylase 15 Minuten bei 70° und pH = 7 gehalten. Zur Stabilisierung des Enzyms wurden dann 3 ml gekochter Rohlösung zugesetzt, und von der Mischung 15 ml zum Versuch angewendet. Trockengewicht 0,0058 g. Tabelle 9.

Tabelle 9

Zeit	Versuch 1			Versuch 2		
	% „Maltose“ aus der Reduktion berechnet	Gärungsversuche		% „Maltose“ aus der Reduktion berechnet	Gärungsversuche	
		% Glucose	% Maltose + Maltotriose		% Glucose	% Maltose + Maltotriose
0	36,6	0	0	36,2	0	0
2 Min.	37,7	—	—	37,6	—	—
4 »	39,3	—	—	38,1	—	—
15 »	40,6	—	—	40,3	—	—
20 »	41,1	4,4	20,2	42,0	—	—
30 »	42,7	—	—	41,6	—	—
65 »	44,4	—	—	43,4	4,0	14,8
70 »	45,1	4,5	20,3	43,6	—	—
150 »	46,6	—	—	45,2	—	—
520 »	54,1	—	—	51,0	5,3	21,6
540 »	54,1	5,3	29,1	—	—	—
22,5 Stunden	61,6	7,2	39,5	61,8	—	—
47 »	—	—	—	70,9	7,2	41,0
56 »	73,1	8,2	45,7	—	—	—
77 »	77,8	9,0	—	—	—	—
94 »	—	—	—	79,2	8,0	39,0
150 »	86,4	—	—	84,0	—	—
237 »	—	—	—	87,1	—	—
407 »	100,3	16,3	66,3	—	—	—

In der Abbildung 5 ist der Hydrolysegrad gegen die Zeit aufgetragen. Die Werte der beiden Versuche fallen sehr nahe zusammen. Es kann also mit grosser Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass die α -Malzamyase allein für den beobachteten Reaktionsverlauf verantwortlich ist; die „Nachverzuckerung“ ist nicht etwa durch andere Glucosidasen verursacht.

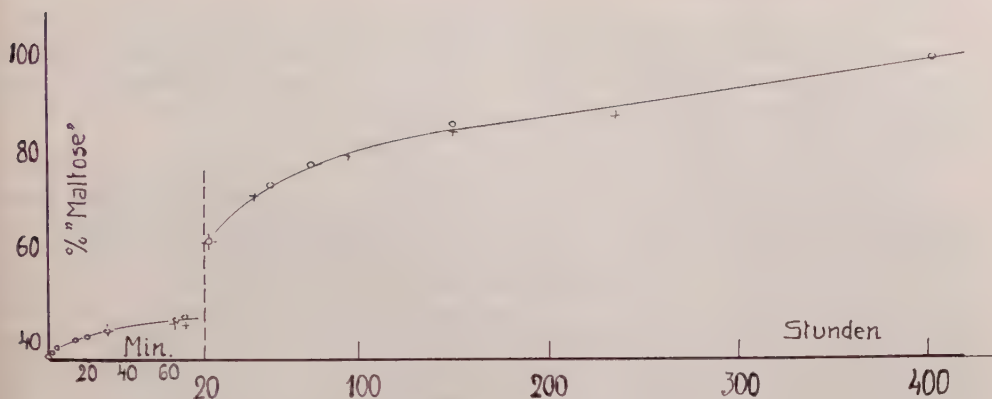


Fig. 5.

 Wirkung von roher und gereinigter α -Malzamylyase.

—○— Rohlösung

—+—+— gereinigte Lösung.

Die lange anhaltende Wirkung der α -Malzamylyase erklärt warum bei der Stärkespaltung mit Malzextrakt keine endgültige Verzuckerungsgrenze und dementsprechend auch keine reproduzierbare Mischung von Grenzdextrinen erhalten wird. Wie mehrmals hervorgehoben ist die Ausbeute an Grenzdextrinen und das mittlere Molekulargewicht derselben zu einem gewissen Grade von den Versuchsbedingungen (Versuchszeit, Enzymmenge, Temperatur usw.) abhängig. Praktisch wird zwar eine Art Verzuckerungsgrenze bei einer scheinbaren Maltoseausbeute von etwa 80% erreicht. Dehnt man aber die Versuchszeit sehr lange aus, so geht die Spaltung sehr langsam weiter, wobei aus den primär entstandenen Grenzdextrinen unter Abspaltung von vergärbaren Zuckern sekundäre Grenzdextrine mit niedrigerem Molekulargewicht hervorgehen (8). Diese sekundäre Spaltung ist nach dem obigen der α -Malzamylyase zuzuschreiben. Am längsten bleiben bei der Spaltung die Isomaltosebindungen bestehen; ob sie von den wirklichen Amylasen angegriffen werden, ist noch eine offene Frage. Nach sehr langen Versuchszeiten erhält man vorzugsweise teils Trisaccharide mit je einer Maltose- und einer Isomaltosebindung teils Isomaltose.

Wie die in der Tabelle 9 angeführten Gärversuche zeigen, ist nicht nur der Hydrolysegrad sondern auch die Bildung der gärfähigen Zucker für beide Amylasepräparate dieselben.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Versuche über die Wirkung der Malzamylyasen auf niedrigmolekulare Spaltprodukte werden beschrieben. Glucose, Maltose und Maltotriose werden durch Vergärung bestimmt. Für die Bestimmung etwa entstehender Maltotriose werden approximative Methoden angegeben.

2. Aus normal gebauten Stärkeabbauprodukten d. h. solchen mit nur Maltosebindungen im Molekül, bildet die β -Amylyase ausschliesslich Maltose für den Fall, dass die Kette des Substrats geradzählig ist. Ist sie ungeradzählig, so entsteht pro Substratmolekül je ein Molekül Maltotriose. Die Maltotriose wird vom Enzym nicht angegriffen.

3. Die β -Amylase bildet in keinem Fall Glucose. Im Falle eines verzweigten Moleküls greift sie die Kette, die die reduzierende Endgruppe trägt, nicht an. Die Endketten mit nicht reduzierenden Endgruppen werden dagegen abgebaut, wobei je nach der Zähligkeit dieser Ketten und der Länge der die reduzierende Endgruppe tragenden Kette verschiedene Grenzdextrine erzeugt werden.

4. Bei der Spaltung der erwähnten Substrate (sowie der der Stärke) mit α -Malzamyase kann in mässigen Zeiten keine endgültige Verzuckerungsgrenze beobachtet werden; die Spaltung schreitet mit immer abnehmender Geschwindigkeit sehr lange fort. Es wird gezeigt, dass die langsame „Nachverzuckerung“ eine Wirkung der α -Malzamyase ist und nicht etwa von zufällig anwesenden anderen Glucosidasen in den Malzextrakten herrührt. In Anschluss an älteren Versuchen wird die Wirkungsweise der α -Malzamyase diskutiert. Das Enzym bildet Glucose als primäres Spaltprodukt; die Glucosebildung ist also nicht von der Anwesenheit der Maltase abhängig. Bei der Spaltung der hier infragekommenden Substrate werden anscheinend zunächst grosse Mengen von Maltotriose gebildet; sie verschwindet dann aber wieder, vermutlich weil die α -Amylase die Fähigkeit hat, Maltotriose langsam in Maltose und Glucose zu zerlegen. Es kann also geschlossen werden, dass die α -Malzamyase wenigstens eine terminale Bindung eines Kettenmoleküls zu spalten vermag.

Dem Schwedischen Naturwissenschaftlichen Forschungsrat danken wir für Unterstützung dieser Arbeit.

Institut für organische Chemie und Biochemie der Universität, Stockholm.

LITERATUR. 1. K. Myrbäck, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 3, S. 251, Academic Press, New York 1948. — 2. K. Myrbäck, B. Örtenblad und K. Ahlborg, *Biochem. Z.* 307, 53 (1940); K. Myrbäck und K. Ahlborg, *Biochem. Z.* 307, 69 (1940). — 3. K. Freudenberg und H. Boppel, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 73, 609 (1940); *Naturwiss.* 28, 264 (1940). — 4. K. Myrbäck und G. Nycander, *Biochem. Z.* 311, 234 (1941). — 5. K. Myrbäck und E. Leissner, *Arkiv kemi, mineral. geol.* 17 A, Nr 18 (1943). — 6. K. Myrbäck und N. O. Johansson, *Arkiv kemi, mineral. geol.* 20 A, Nr 6 (1945); L. G. Sillén und K. Myrbäck, *Svensk kem. tid.* 56, 142 (1944). — 7. K. Ahlborg und K. Myrbäck, *Biochem. Z.* 308, 187 (1941). — 8. K. Myrbäck, *Svensk kem. tid.* 58, 119 (1946).

Tryckt den 26 januari 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

On the measurement of radioactivity from paper chromatogram

By OLOV LINDBERG and J. P. HUMMEL

With 3 figures in the text

In recent years, partition chromatography on paper has found rather general application for the analysis of small amounts of compounds which are difficult to characterize with ordinary chemical methods (1). The advantage of adsorption methods and particularly paper chromatography is that both the qualitative identification and the isolation of the substances in question is permitted. This renders paper chromatography particularly suitable for experiments using radioactive tracers. By measurement of the radioactivity from a given area of the dried filter paper and then estimation of the amount of the substance found on the same area, the degree to which a given component incorporates the radioactive isotope may be calculated. Since in such measurements, a filter paper of uniform thickness is always used, the internal absorption of the radiations must obviously be very constant, which renders this technique especially useful for radioisotopes with very soft emanation. On the other hand, the method requires a high specific activity in the substance to be determined, and therefore is less suitable for isolation procedures from large animals. It promises to be, however, a valuable adjunct to metabolism studies chiefly with tissue extracts, tissue culture and Warburg experiments.

Procedure

The filter paper used was Munktells No. 8 which was cut into strips 15 mm wide and 500 mm long by a local book-binder. An accurately determined volume of approximately 10 mm³ was placed on the point of origin (marked with pencil) with a pipette shown in Fig. 1, similar to that described by LINDERSTRÖM-LANG & HOLTER (6). If insufficient impulses were contained in this volume further additions could be made on the strip after the drying of each aliquot. The chromatograms were developed in chambers similar to those described by CONSDEN, GORDON and MARTIN (2). When the solvents had travelled a suitable distance depending upon the R_F values of the components, the strips were dried well

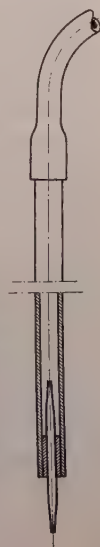


Fig. 1. Pipette according to Linderström-Lang & Holter.

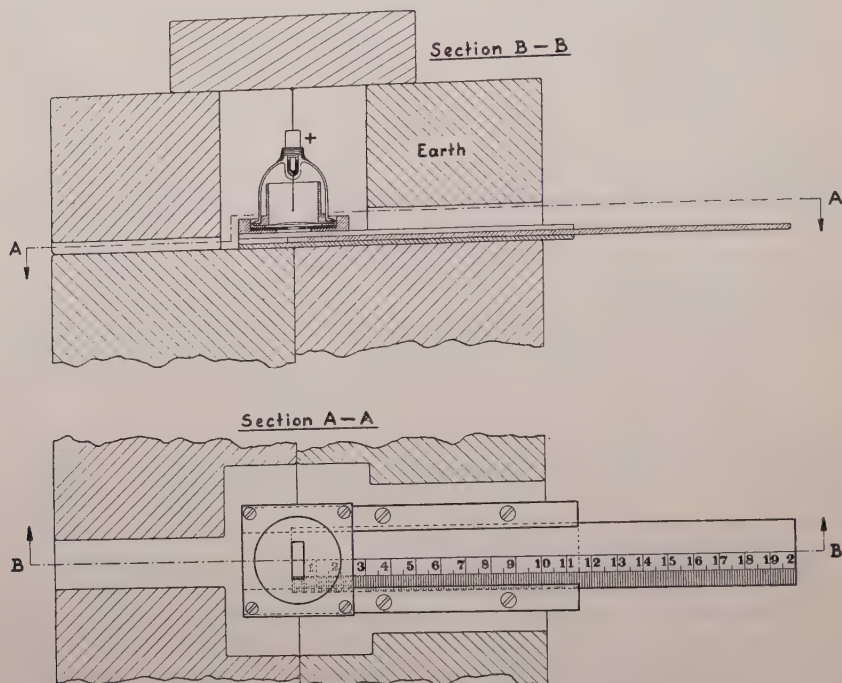


Fig. 2. Figure showing arrangement for the reading of radioactive paper chromatograms under G.-M. tube.

in an airstream. The length of the dry strips was extended by parting a strip of glossy paper about 20 cm long on the beginning end. With the point of origin marked as zero, the strip was graduated in each direction every 5 cm with a pencil mark. The radioactivity was localized and measured by drawing the strips thus prepared in steps of 5 mm under a Geiger-Müller tube, shown in Fig. 2. The window in the tube was shielded with a lead plate 1.5 mm thick in which a rectangular window was cut measuring 5×15 mm. The position of the segment lying directly under the window was adjusted with the help of the steel rule set at the base of the chamber and the graduation marks on the paper. To standardize the scatter error in the above method, a 5 mm segment of the strip, in which the radioactivity had been just previously determined by the method above, was cut out and again placed under a similar G.-M. tube having no lead window in between. Values about 10 % higher were obtained by the latter procedure, due probably to the greater number of β -particles which pass diagonally into the periphery of the G.-M. tube. When the paper-segment was extracted with water and the phosphate precipitated with Na_2HPO_4 and magnesium citrate in ammonia solution, as described earlier by LINDBERG (3), the same values were obtained as by the direct measurement on the paper.

The following experiment, which illustrates the suitability of this method for the study of phosphorylation reaction, was patterned after the type used by POTTER (4). A low tissue concentration was used to approximate the action of the pure

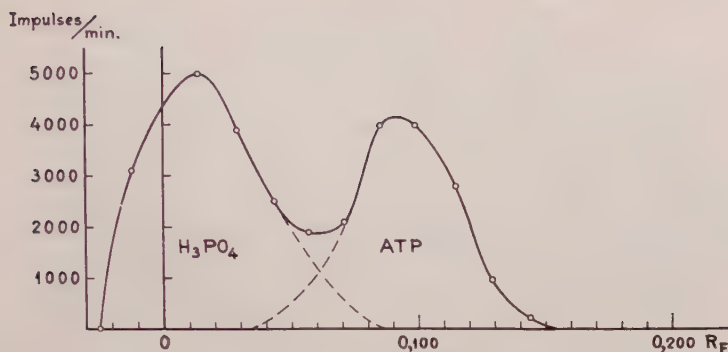


Fig. 3. Curve showing the radioactive pattern on a paper chromatogram from an experiment where adenosinetriphosphate was formed from diphosphopyridinenucleotide. See text.

enzyme system. A very small amount of orthophosphate having a high specific activity was also employed.

A fresh rat kidney homogenate (0.2 ml of a 10 % suspension in 1 % KCl) was mixed with 50 μ M of sodium glutamate, 5 μ M of DPN, 100 μ M of KCl, 200 μ M of NaF, 5 μ M of MgCl_2 , and 1 μ M of Na_2HPO_4 containing 10 μ C of P^{32} in a 0.01 H bicarbonate buffer at pH 7.7. The total volume was 1.5 ml. After 20 minutes incubation in air at 30°, the reaction was stopped by the addition of 0.5 ml of cold 20 % trichloroacetic acid. After centrifuging in the cold the clear supernatant was extracted 3 times with 5 volumes of water to remove the trichloroacetic acid. The chromatographic analysis was carried out by adding 12.0 cmm of this solution to the starting point of the filter paper strips as above. The solvent employed was a mixture of equal parts of phenol and n-butanol saturated with water which required 11 hours to pass 40 cm. When the solvent had travelled a suitable distance, the strips were removed from the liquid and dried in an airstream overnight.

The radioactivity was measured as described above. The migration of ATP was determined by measuring the absorbtion at 260 $m\mu$ of water-extracts of similar chromatograms of known ATP solutions. A prior extraction of the strips with ether was necessary to remove the phenol. The migration of orthophosphate was determined, from the radioactivity curves of chromatograms of unincubated extracts of control experiments.

It can be seen from Fig. 3, that a clear separation of ATP and orthophosphate was found. No other fraction appeared, but may be present in such small amounts as to be entirely masked. ATP in this case must have been formed from the adenylic acid released by DPN destruction (5).

By suitable concentration procedures by the use of different solvents, and different papers, more distinct separations of the nucleotides have been achieved. A more complete report will be published shortly.

From the Wenner-Gren Institute of exp. Biology, University of Stockholm.

REFERENCES. (1) *Annals New York Ac. Sci.* Vol. XLIX 141–326 1948. — (2) **Consden, Gordon and Martin**, *Biochem. J.* 38, 224 (1944). — (3) **Lindberg, O.**, *Arkiv f. Kemi*, 23A No 2 1946. — (4) **Potter, V.**, *J. Biol. Chem.* 169, 17 (1947). — (5) **Kornberg, A. & Lindberg, O.**, *J. Biol. Chem.* 176 1948. — (6) **Holter, P.**, *C. r. Lab. Carlsberg. Série chimique* 24, No. 17.

Morphological studies on salt precipitated bacterial flagella

By CLAES WEIBULL

With 2 plates

Preparation of bacterial flagella in a highly purified state by preparative ultra-centrifugation has been described previously (1) (2). In order to free the flagella from the last traces of impurities, precipitation with ammonium sulphate has now been tried. The chemical effect of this proceeding will be described elsewhere. In this paper a short account of some interesting physicochemical facts will be given.

As has been reported already, the precipitation is reversible (1). The proceeding of the precipitation is the characteristic one for proteins: on adding the salt solution to the suspension of the flagella in distilled water, a turbidity appears and after enough salt having been added a floccular precipitate appears. When stirring the precipitate a slight streaming turbulence is noted.

Flagellar preparations of *Bac. subtilis* and *Proteus vulgaris* have been treated in this way. Flagella from the former organisms seem to be somewhat easier precipitable than *Proteus* flagella, but complete precipitation is accomplished in both cases after half saturation with ammonium sulphate, brought to pH 7 with ammonia.

Plate I shows a microscopic photograph of the precipitate, formed by the flagella and suspended in the mother liquor. Only one structural element can be seen, spirals of quite regular periods along the axis. Furthermore, since the width of the different spiral needles is about the same and as they must be supposed to be freely rotated round their axis, these spirals must be assumed to be approximately cylindrical.

The dimensions of the spirals were measured on enlarged photographic plates. The width of the spirals could only be determined approximately, since the filament forming the spiral is of varying thickness. $0.5\ \mu$, however, seems to be reasonable mean value.

The period along the spiral axis could be determined with a far greater accuracy, since 5–15 subsequent segments of straight spirals could be measured together and a mean value was calculated. Thus, the interesting fact was revealed that within a few per cent the spiral period along the axis was quite constant for both *Proteus* and *Subtilis* flagella, but distinctly different from each others. — Several plates were measured from different flagellar preparations, precipitated with varying amounts of ammonium sulphate, and containing spiral threads of different thickness. From each preparation at least two plates were measured and 4–8 spirals.

The figures in table I are given with the maximum deviation found.

Table 1.

	Salt saturation	Spiral period, μ
Bac. subt.	0.2	2.50 ± 0.04
	0.5	2.44 ± 0.05
	0.5	2.57 ± 0.03
		Mean 2.50
Proteus vulgaris	0.35	2.02 ± 0.06
	0.5	1.96 ± 0.08
		Mean 1.99

Varying the salt concentration within the limits given has obviously no effect.

Electron micrographs of the precipitated flagella confirmed the results obtained with the ordinary microscope. The salt solution was dried on the objective grids and the gold-shadowing technique was applied. Since the ammonium sulphate formed large crystals on the grids, open spots were obtained between these crystals and no washing procedure was necessary. This proved to be important since the spiral structure found (c.f. below) was destroyed when being washed.

Plate II shows an electron micrograph of salted-out flagella from *Bac. subtilis*. The quite regular spiral structure is amazing. The period of the spirals was found to be $2.59 \pm 0.06 \mu$, i. e. within the experimental errors the same as found with the light microscope. Thus no changes in the structure seem to have occurred on drying. — It is also easily seen that the individual flagella, building up the spirals are lying side by side and do not seem to be twisted to any appreciable extent.

The spiral structure is wellknown from a number of biological structures and also the bacterial flagella have previously been found to appear like spirals when observed in dark field microscopy (3) or by staining methods. However, the present investigation shows the possibility of obtaining quite regular spiral structures by applying a simple physicochemical procedure, a salt precipitation, on a chemically well-defined material. As far as the author knows, this procedure has previously been shown to be able to form regular structures only of the classical crystalline (or paracrystalline) type.

This investigation is part of a program on the structure of bacterial flagella which is financially supported by the Swedish Natural Science Research Council.

Uppsala, Institutes of Physical Chemistry and Biochemistry.

REFERENCES. (1) S. Gard, Arkiv Kemi, Min. Geol. Band 9 A N:o 21 (1947). — (2) C. Weibull, Biochimica et Biophysica Acta 2 (1948) (in press). — (3) A. Pijper, Zentr. f. Bact. 123 (Originale), 195 (1931–32).

Tryckt den 26 januari 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

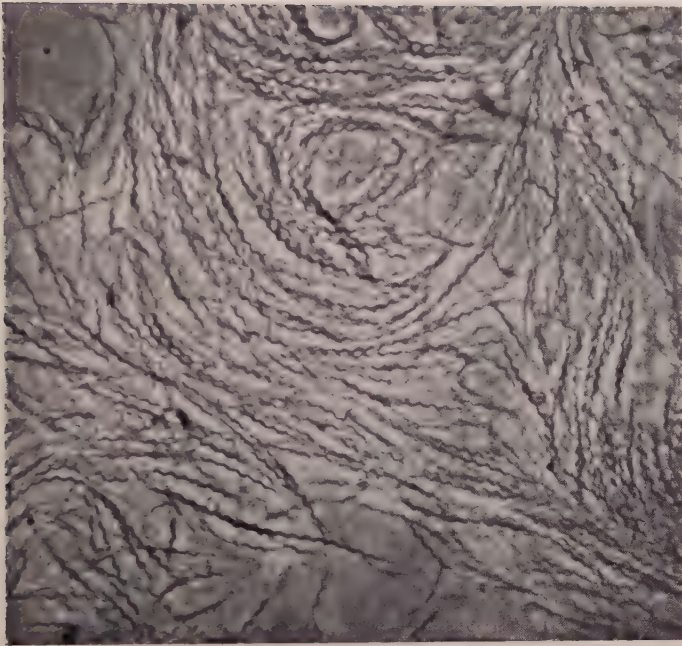


Plate I Microphotograph of salt precipitated flagella from *Bac. subtilis*. Magnification $710\times$.

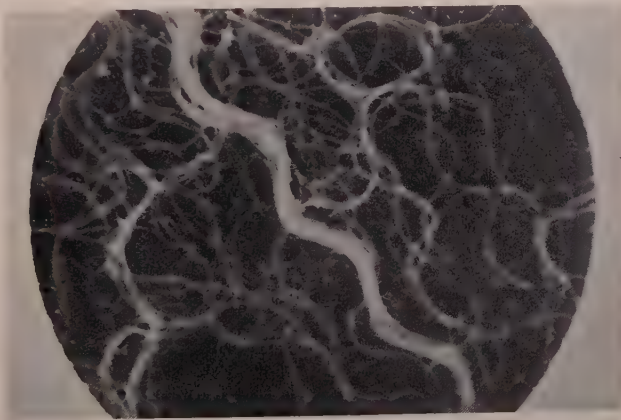


Plate II. Electron micrograph of salt precipitated flagella from *Bac. subtilis*. Magnification $7\,600\times$. Weak gold shadowing.

Ribonucleic acid in plants

By H. v. EULER and L. HAHN

In a previous paper (1) dealing with the concentrations of ribo- and desoxyribonucleic acids in animal organs, methods for extraction and determination of both types of nucleic acids were proposed for the analysis of this material. The determination of ribonucleic acid in the organ extracts was carried out by the phloroglucinol colour reaction, described earlier (2). As it was emphasized by the present authors, this colorimetric method gives correct results within certain limits only so far as the material, after purification by precipitating with La-acetate, is free from pentoses or pentose-containing compounds other than nucleic acids and other nucleide derivatives.

After we had published our analyses of ribonucleic acid in plant tissues (3), in which we took the pectin content of leaves into consideration, we considered it necessary to collect further experimental results concerning the limits of applicability of the methods that were given by us for animal tissues.

Method for extraction and determination of ribonucleic acid in leaves

Extraction. The following procedure gave the most satisfactory results.

1 g of the minced plant tissue was ground with 10 ml 0.5 N-NaOH and the mixture kept at room temperature for 2 hours. After centrifuging, the residue was extracted twice more in the same manner. The residue, thus obtained, was heated with 10 ml 0.5 N-NaOH in a boiling water bath for 1 hour, centrifuged and the residue heated once more with 10 ml 0.5 N-NaOH for 2 hours. From the combined extracts ribonucleic acid was precipitated as lanthanum salt and determined colorimetrically by the phloroglucinol method as described in earlier papers.

In this procedure the bulk of the ribonucleic acid is extracted by alkali at room temperature. Although a part of the ribonucleic acid, still present in the residue after this extraction, is destroyed during the following treatment with hot alkali, this loss does not exceed 5 per cent of the *total* RNA content of the tissue.

Determination. Applying the above procedure to different leaves, we obtained extremely high values of RNA. These results are caused, as we could state in our publication "Nukleinsäuregehalt grüner Blätter II" (3), by the fact that in the leaves pentose containing compounds other than nucleic acids are present, which are precipitated by lanthanum acetate. Furthermore, a not negligible part of the pectin fractions does not loose its precipitability when heated with 0.5 N-NaOH

for 3 hours, thus showing the same behaviour as ribonucleic acid under corresponding conditions. Although the chief part of pectins and pectin-like substances are thus removed during the above-given procedure of extraction and purification of ribonucleic acid, the remaining part of these compounds disturbs very markedly the determinations of ribonucleic acid, due to the very high content of pectins in most plant tissues. This can be seen from the results in Table I, which contains data on the ribonucleic acid content of spinach leaves determined according to the method given above.

Table I. Content of Ribonucleic Acid + Other Pentose-containing Compounds, Precipitable with Lanthanum Salts.

Fractions of Spinach Leaves	mg Ribonucleic Acid /g Fresh Tissue		mg Ribonucleic Acid /g Dry Weight	
I	6.0	5.9	68.5	68.0
II	7.3	7.5	73.2	75.2
III	9.2	9.3	79.9	80.8
IV total	10.5	10.7	79.0	80.5
IV juice	0.52	0.58	7.4	8.2
IV residue	30.3	31.2	137	142
V juice	0.35	0.29	6.1	5.1
V residue	47.0	46.0	157	153

A part of the leaves was squeezed out and the juice as well as the residue were analysed. As can be seen, most of the pentose-containing, with lanthanum salts precipitable fraction of the leaves was found in the residue, the amount in the juice being only 7–10 per cent of the total content. There hardly can be any doubt that the pentoses obtained from the residue, at least to a very great extent, derive from compounds other than nucleic acids.

In addition to the pectin fractions mentioned above, other similar compounds may occur in leaves which cannot be extracted by water but are going into solution when the tissue is treated with cold and hot alkali respectively, and consequently they appear in the nucleic acid fraction. Such compounds may be precipitated by lanthanum salts under the conditions used.

Attempts to separate the ribonucleic acid from compounds, disturbing the determination, thus far did not give satisfactory results. By precipitating with lanthanum acetate in watery solution instead of in 60 per cent alcohol, some of the pectins and similar compounds were actually removed; losses of nucleic acid, however, occur at the same time. By precipitating the nucleic acids from the alkaline extract at pH 4 in addition to a part of disturbing impurities some ribonucleic acid was found to be removed as well.

Determination of ribonucleic acid in leaves of aspen

The leaves from a 4 years old tree of aspen (*Populus tremula*; No 204 from our experimental field at Solna) were squeezed out and the juice obtained was centrifuged at 2 000 r. p. m. for half an hour. Three fractions were obtained: a) Centrifugate, b) Precipitate, c) Residue.

In one aliquot of each fraction the dry weight was determined, while in another aliquot ribonucleic acid was estimated, following the procedure described on p. 1-2.

The leaves from three other trees of *Populus tremula* (No 134, 155 and 208 from our experimental field) were treated in a similar way, the juice from these leaves producing no precipitate when centrifuged as above. The results are seen from Table II. Compared with the spinach juice, very much higher values were obtained in the juice of both kinds of aspen leaves. This result depends — at least partly — on the fact that the water content of the aspen leaves was much smaller than that of the spinach leaves and that therefore a higher pressure had to be used for the preparation of the aspen juice.

Table II. Determination of Ribonucleic Acid in Aspen Leaves.

Fraction	Content of Dry Sub-stance (%)	Content of Ribonucleic Acid + Other Pentose-contain- ing Compounds Precipitable with La-acetate calculated as mg Ribonucleic Acid			
		per g Fresh Weight	per g Dry Weight	per g Total Leaves	per g Total Dry Leaves
<i>Large Leaves</i>					
Juice centrifuged ..	16.6	8.3	49.7	1.9	5.3
Juice precipitated ..	27.6	17.5	63.5	5.3	15.2
Residue	73.9	166	225	78.2	223
<i>Small Leaves</i>					
Juice	15.4	9.2	59.8	4.1	8.8
Residue	69.7	65.0	93.3	35.8	77

Determination of ribonucleic acid in pollen of birch

0.5 g of pollen from birch (*Betula pubescens*) were ground in a mortar with glass powder under addition of 15 ml 0.5 N-NaOH successively. The mixture was kept at room temperature for 2 hours and then centrifuged. The residue was extracted twice with the same solvent and the extracts obtained were combined, amounting to the volume of 50 ml: *Fraction A*.

The residue was extracted with 12 ml of 0.5 N-NaOH for 2 hours in a boiling water bath, this procedure being repeated once more. The combined hot alkali extracts were denoted: *Fraction B*.

An aliquot (20 ml) of Fraction A was precipitated in the usual way with lanthanum acetate (Fraction A₁). Another aliquot (20 ml) was heated in a boiling water bath for 1 hour and then precipitated (Fraction A₂).

Fraction B was precipitated as well. Ribonucleic acid was determined in Fractions A₁, A₂ and B, the result being seen from Table III.

The difference between the amount of pentose found in Fractions A₁ and A₂ is largely due to the destruction of a part of the ribonucleic acid present in the cold alkali extracts. There is no indication of the presence in the pollen extracts of large amounts of pentose containing lanthanum-precipitable compounds of the type of the pectine from orange peels.

Table III. Determination of Ribonucleic Acid in Fractions from Birch Pollen.

Fraction	mg RNA/g Fresh Pollen		mg RNA/g Dry Weight	
A ₁	52.5;	53.5	58.7;	59.7
A ₂	44.2;	46.8	49.4;	52.3
B	16.2;	14.7	18.1;	16.5

SUMMARY

The phloroglucinol method recently described by the present authors for the determination of ribonucleic acid in *animal organs* cannot be applied to the determination of ribonucleic acid in plant tissues without removing pectins and other pentose-containing plant constituents. This result, indicated in a previous paper, has been stated by new experiments on spinach leaves, on aspen leaves and on pollen of birch (*Betula pubescens*).

Stockholm, University, Institute for research in organic chemistry.

REFERENCES. (1) H. v. Euler and L. Hahn, Archives of Biochem. 17, 285 (1948). — (2) H. v. Euler and L. Hahn, Svensk Kem. Tidskr. 58, 251 (1946). — (3) H. v. Euler and L. Hahn, Sv. Vet.Akad., Arkiv f. Kemi 26 A, No 11 (1948).

Tryckt den 26 januari 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über den Stoffwechsel von *Streptococcus citrovorus*

Von FOLKE BÅNG

Mit 3 Figuren im Text

Gewisse Typen von Milchsäurestreptokokken sind besonders wichtig für die Herstellung von Meiereiprodukten. Diese „meiereiwichtigen“ Bakterien, die im übrigen von allgemeinerem Gesichtspunkt aus betrachtet für den Welthaushalt von grosser Bedeutung sind, treten oft in spontan gesäuerter Milch auf. In Reinkulturen gezüchtet nennt man sie in den Meiereien „Säurewecker“.

Vieles deutet daraufhin, dass manchmal die verschiedenen Typen von Milchsäurestreptokokken nur als von äusseren Verhältnissen bedingte Modifikationen aufzufassen sind. Die Tatsache, dass die Milchsäurebakterien ihren Charakter verändern und von der einen Modifikation in die andere übergehen können, macht sie jedoch gleichzeitig interessanter, nicht zum mindesten vom Standpunkt der Meierei aus.

Im Folgenden seien gewisse Wechsellerscheinungen, die im Stoffwechsel eines bekannten und für die Meierei-Industrie sehr wichtigen Streptokokkentyps auftreten können, behandelt. Es handelt sich um einen heterofermentativen Milchsäuregärungs-Erreger¹, der im allgemeinen mit dem Namen *Streptococcus citrovorus* (HAMMER 1918) oder *Betacoccus cremoris* x Form (KNUDSEN u. SØRENSEN 1929) (ORLA-JENSEN 1943) bezeichnet wird. Dieser Bakterientyp wird, da er Butteraroma, Diacetyl ($\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$), zu bilden vermag, auch als Butteraromabakterium bezeichnet.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird er der Einfachheit halber *Streptococcus citrovorus* genannt.

Die folgende Tabelle A enthält einige allgemeine Merkmale von *Streptococcus citrovorus*.

Bezüglich des Verhaltens von *Streptococcus citrovorus* in Milch (und zwar in durch Erhitzen sterilisierter Milch) ist besonders zu bemerken, dass sich dieses Bakterium ziemlich langsam entwickelt.

Die Entwicklung von *Streptococcus citrovorus* in Milch kann, wie durch die Arbeiten verschiedener Forscher bekannt ist, durch Zusatz von kleinen Mengen verschiedener Aminosäuren beträchtlich gefördert werden. Die Entwicklung wird auch durch Zusatz einer geringen Menge Hefeautolysat bzw. Hefewasser (d. h. einer Hefeabkochung) weitgehend beschleunigt.

Die Abb. 1 zeigt das Verhalten von *Streptococcus citrovorus* in Lackmusmilch, sowohl ohne wie mit Zusatz von Hefewasser.

¹ Heterofermentative Milchsäurebakterien bilden bei der Vergärung von Zucker ausser Milchsäure auch andere Stoffe wie z. B. Essigsäure, Kohlensäure u. a.; homofermentative Milchsäurebakterien bilden bei der Vergärung von Zucker nur Milchsäure.

Tab. A.

Identifizierung	Typ <i>Streptococcus citrovorus</i>
Optim. Wachst. Temp. in Milch	30° C
Entwicklung in Milch	Langsam. Koaguliert nicht
Lackmusmilch-Test	Atypisch ¹ (BÂNG 1937)
CO ₂ -Bildung	beträchtlich

¹ Die Milch färbt sich rot.



Abb. 1.

Streptococcus citrovorus in Lackmusmilch mit und ohne Zusatz von 10 % Hefewasser.

In dem Reagensglas mit Hefewasserzusatz ist die Milch koaguliert und das Koagulat ist durch die reichliche CO₂-Entwicklung gesprengt. Im Reagensglas ohne Hefewasser ist die Milch nicht koaguliert. In beiden Fällen ist die Lackmusmilchreaktion atypisch.

Das Hefewasser wurde durch $\frac{1}{2}$ stündiges Kochen von 100 g Hefe in 1000 g Wasser hergestellt; nach dem Kochen wurde die Hefe abzentrifugiert.

ohne Hefewasser ——— ↑
mit Hefewasser ——— ↑

Bei näherem Studium des Kohlehydrat-Stoffwechsels von *Streptococcus citrovorus* in Suspensionen fand ich u. a., dass dieses Bakterium in einer Sauerstoff-aufnehmenden, atmenden Modifikation und in einer, möglicherweise auch in zwei nicht atmenden, nicht Sauerstoff-aufnehmenden Modifikationen auftreten kann (BÂNG 1944).

Streptococcus citrovorus entwickelt sich in Milch in Gegenwart von anderen Bakterien, u. a. auch Milchsäurebakterien wie z. B. *Streptococcus lactis*, bedeutend schneller als in Reinkultur.

Die atmende Modifikation von *Streptococcus citrovorus* wurde von mir mit der Bezeichnung *aspirans*, die nicht-atmende Modifikation, die im Folgenden behandelt werden soll, mit dem Zusatznamen *non aspirans* I versehen. Beide Modifikationen entwickeln bei ihrem Zuckerabbau reichlich Kohlendioxyd.

Die beiden Modifikationen von *Streptococcus citrovorus* - *aspirans* und *non aspirans* I — können in einander übergehen.

Wird ein Stamm von *Streptococcus citrovorus* bei 20° C und unter im übrigen geeigneten Bedingungen gezüchtet, so erhält man die *aspirans*-Modifikation, die sich durch die bei ihr ausgeprägte Fähigkeit, Sauerstoff aus der Luft aufzunehmen, auszeichnet. Wird die Züchtung hingegen bei 37° C vorgenommen, so entwickelt sich ausschliesslich die nicht atmende, nicht sauerstoffaufnehmende Modifikation *non aspirans* I.

Der Stoffwechsel der zwei verschiedenen Bakterien-Modifikationen wurde von mir u. a. in Suspensionen untersucht.

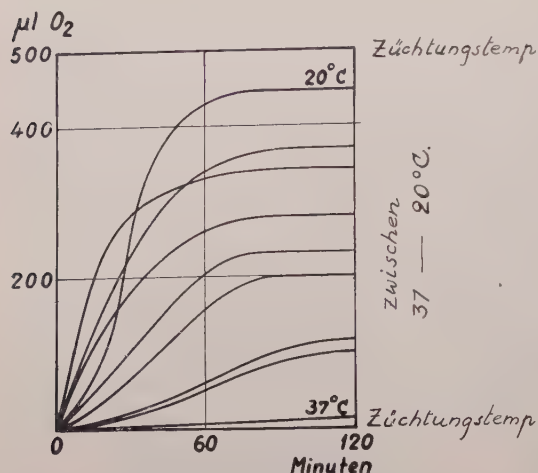
Bei der Herstellung der zu Versuchen mit Suspensionen erforderlichen Bakterienmengen wurden die Züchtungen auf Agar-Nährsubstrat ausgeführt. Es wurden Milch-Agar mit einem Zusatz von Hefewasser resp. Zucker-Bouillon-Agar mit Hefewasserzusatz sowie in gewissen Fällen mit einem Zusatz von Citrat benutzt. Jedoch wurden auch andere Substrate wie Hefewasser-Zucker-Agar und Molken-Agar zur Bereitung der Bakterien für Suspensionsversuche verwendet. Die Züchtungsdauer bei der Herstellung der Bakterienmasse für die Suspensionen betrug zwischen 24 und 36 Stunden. Im übrigen wurden die beiden Streptokokken-Modifikationen in Milch gezüchtet.

Die so hergestellte Bakterienmasse wurde, ehe sie zu den Versuchen benutzt wurde, von dem Nährsubstrat, auf dem sie gezüchtet worden war, durch wiederholte Waschungen befreit.

Tab. B.

Sauerstoff-Verbrauch und Kohlendioxyd-Bildung von bei verschiedenen Temperaturen gezüchtetem *Streptococcus citrovorus*. Warburg-Versuche bei 30° C. Suspensionen mit 3,6 mg Glukose in 1/15 mol. Phosphatpuffer-Lösungen. pH 6,5.

Züchtungstemp.	Sauerstoff-Verbrauch (μ l)	Kohlendioxyd-Bildung (μ l)
20° C	425	445
	418	430
	408	440
30° C	109	427
	189	438
	258	445
37° C	82	428
	21	445
	17	450



Die Kurven zeigen den Sauerstoffverbrauch von *Streptococcus citrovorus* in Suspensionen nach einer Züchtung des Bakteriums bei verschiedenen Temperaturen. (Höchste Temperatur 37° C, niedrigste Temperatur 20° C).

Bei allen Versuchen wurde den Suspensionen 3,6 mg Glukose zugesetzt; der Zucker wurde bei allen Versuchen vollständig verbraucht. Alle Versuche mit Suspensionen wurden, unabhängig von der Züchtungstemperatur, bei 30° C ausgeführt.

Die Menge der gebildeten Kohlensäure war in allen Fällen, unabhängig von der Züchtungstemperatur, gleich gross. Nur der Sauerstoffverbrauch variierte.

Tabelle B zeigt die Variation des Sauerstoffverbrauchs, der Atmung, eines *Streptococcus citrovorus* Stammes, wenn der Stamm bei verschiedenen Temperaturen (20, 30 u. 37° C) kultiviert worden ist.

Die Stoffwechseluntersuchungen mit Suspensionen wurden bei allen in dieser Arbeit erwähnten Versuchen, unabhängig von der Züchtungstemperatur der Bakterien, stets bei 30° C ausgeführt. Die Versuchszeit war im allgemeinen kürzer als 30 Minuten.

In Abb. 2 sind einige Kurven über den Sauerstoffverbrauch eines *Streptococcus citrovorus* Stammes, der bei verschiedenen Temperaturen zwischen 20 und 37° C gezüchtet wurde, dargestellt.

Wie die Abbildung 2 zeigt, kann der Sauerstoffverbrauch beim Glukose-Abbau durch *Streptococcus citrovorus* beträchtlich variieren. Die Variationen sind von der Temperatur bei der Züchtung abhängig. Eine höhere Züchtungstemperatur führt zu einem geringeren Sauerstoffverbrauch und umgekehrt eine niedrigere Temperatur bei der Züchtung zu einem höheren Verbrauch von Sauerstoff.

Tabelle C veranschaulicht Sauerstoff-Verbrauch und Kohlensäure-Bildung bei einem *Streptococcus citrovorus*-Stamm, der 2 Jahre lang parallel bei 20° C und 37° C gezüchtet worden ist und bei dem die Züchtungstemperaturen sodann vertauscht wurden, sodass die Kultur, die bei 20° C gehalten worden war, nun bei 37° C gezüchtet wurde, und diejenige, bei der die Züchtung bei einer Temperatur von 37° C erfolgt war, bei 20° C fortgesetzt wurde. (Züchtungsdauer 36 Stunden.)

Wie aus der Tabelle hervorgeht, hat ungeachtet der zweijährigen Züchtung bei konstanter Temperatur in Milch mit jeden 2. Tag erfolgter Umimpfung eine Veränderung der Züchtungstemperaturen für die beiden Parallelkulturen zur Folge, dass der Stoffwechsel unmittelbar verändert wird. Die *aspirans*- geht in die *non aspirans* und die *non aspirans*- in die *aspirans*-Modifikation des Bakteriums über.

Die Resultate von ausgeführten Analysen deuten an, dass *aspirans* aus 1 Mol Glukose 1 Mol Milchsäure, 1 Mol Essigsäure und 1 Mol Kohlendioxyd bildet, während bei *non aspirans I* dieselbe Menge Glukose 1 Mol Milchsäure, 1 Mol Äthylalkohol und 1 Mol Kohlendioxyd (BÄNG 1943 u. 1944) ergibt.

Tab. C.

Parallelzüchtung von *Streptococcus citrovorus* unter verschiedenen Temperaturverhältnissen (a und b).

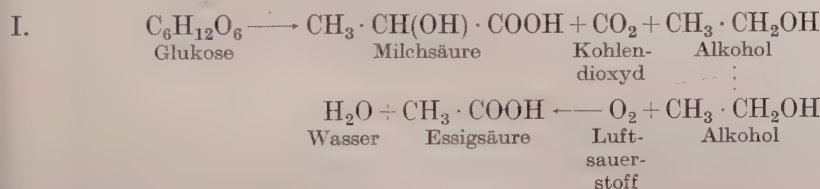
a) Züchtung zunächst 2 Jahre lang bei 20° C, sodann 30 St. bei 37° C.

b) Züchtung zunächst 2 Jahre lang bei 37° C, sodann 30 St. bei 20° C.

Warburg-Versuche bei 30° C mit einem Zusatz von 3,6 mg Glukose.

Züchtung	Vor der Temp.-Änderung			Nach der Temp.-Änderung		
	Temp.	O ₂ -Verbrauch (μl)	CO ₂ -Bildung (μl)	Temp.	O ₂ -Verbrauch (μl)	CO ₂ -Bildung (μl)
a	20° C	415	440	37° C	24	400
b	37° C	5	437	20° C	401	416

Die beiden Modifikationen des Zuckerabbaues durch *Streptococcus citrovorus* können folgendermassen durch Formeln ausgedrückt werden:



Wie wir aus dem für den Stoffwechsel von *aspirans* aufgestellten Schema ersehen, folgt die Aufnahme von Sauerstoff als eine sekundäre Reaktion nach der Kohlendioxyd-Bildung.

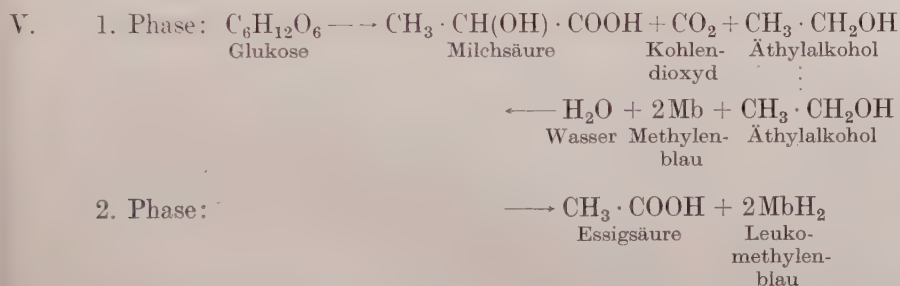
Die *aspirans*-Modifikation, die mit Hilfe von Luftsauerstoff in der 2. Umsetzungsphase Alkohol in Essigsäure umsetzt, besitzt unter gewissen Bedingungen auch die Fähigkeit, gebildeten Äthylalkohol (in der 2. Phase des Zuckerabbaues) in Essigsäure umzusetzen, ohne dass freier Sauerstoff zugänglich ist. Dieses ist der Fall, wenn ein geeigneter Stoff vorhanden ist, der als Wasserstoff-Acceptor dienen kann. In derartiger Weise können nach meinen Feststellungen Diacetyl und Acetylmethylkarbinol wirken. Ohne Sauerstoffzufuhr oder ohne Wasserstoff-Acceptor scheint *aspirans* Zucker nicht umsetzen zu können. Das Enzymsystem von *aspirans* dürfte sich in gewissem Masse von dem Enzymsystem von *non aspirans* unterscheiden.

Der ausserordentlich schnelle Zuckerabbau durch *aspirans* in Gegenwart der Wasserstoff-Acceptoren Diacetyl oder Acetylmethylkarbinol kann auf folgende Weise durch Formeln dargestellt werden:

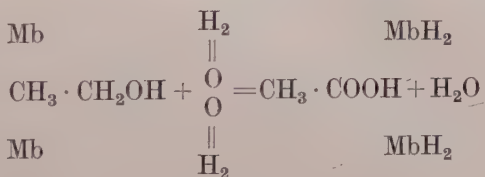
In dem einen Fall -- Kurve I -- wurden 40 μ mol, im anderen Fall -- Kurve II -- 20 μ mol Acetylmethylkarbinol zugesetzt. Ausserdem in beiden Fällen 20 μ mol Glukose.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, hört die Kohlensäureentwicklung des Zuckerabbaues bei einem Zusatz von 20 μmol Acetylmethylkarbinol früher auf als bei Zusatz von 40 μmol . Im ersteren Falle wird nur halb soviel Kohlendioxyd wie im letzteren gebildet. Zuckeranalysen nach derartigen Versuchen ergaben, dass nur ungefähr soviel Zucker umgesetzt worden ist, wie gemäss dem obigen Schema der zugesetzten Menge Acetylmethylkarbinol (oder, wenn Diacetyl benutzt wird, der entsprechenden Menge Diacetyl) entspricht.

Die *aspirans*-Modifikation von *Streptococcus citrovorus* setzt auch unter anaeroben Verhältnissen Zucker um, wenn der Wasserstoff-Acceptor Methylenblau zugegen ist. Während der Umsetzung wird der gebildete Alkohol unter Wasseraustritt zu Essigsäure oxydiert und das Methylenblau wird in seine Leukoform reduziert. Der vermutliche Verlauf dieser Reaktion wurde von mir auf folgende Weise formelmässig dargestellt:



Die letzte Phase der Umsetzung kann auch wie folgt ausgedrückt werden:



Wie ersichtlich, verläuft die Reaktion Methylenblau-Alkohol gleich der früher von mir dargestellten Reaktion, bei der Diacetyl oder Acetylmethylkarbinol als Wasserstoff-Acceptoren dienen.

Die Reduktion von Methylenblau tritt auch in solchen Suspensionen auf, in denen der Zucker gegen Äthylalkohol ausgetauscht ist. Die Reduktion geht allerdings in diesem Fall bedeutend langsamer (BÄNG) als beim Zuckerumsatz.

Untersuchungen über die *non aspirans* I-Modifikation von *Streptococcus citrovorus* sind von mir noch nicht in demselben Umfang wie für *aspirans* ausgeführt.

Gleichwohl sei die eigenartige Tatsache erwähnt, dass *non aspirans I* in Suspensionen Zucker schneller unter aeroben als unter anaeroben Bedingungen umsetzt, obgleich diese Bakterienform während ihres Zuckerabbaues keinen Luftsauerstoff verbraucht. Dieses geht aus Tabelle D hervor.

Tab. D.

Die Kohlendioxyd-Bildung bei Glukoseumsatz von *non aspirans I* unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Temperatur der Suspensionen 30° C.

Versuchsdauer (Min.)	aerob		anaerob
	CO ₂ - Bildung (μl)	O ₂ - Verbrauch (μl)	CO ₂ - Bildung (μl)
20	245	0	135
45	400	7	279
45	330	0	149
30	386	2	120
45	426	15	260

Es sei erwähnt, dass die für die Versuche benötigte Bakterienmasse unter aeroben Verhältnissen bei 37° C gezüchtet wurde.

Nach Angabe mehrerer Forscher bildet *Streptococcus citrovorus* in Suspensionen in saurem Medium reichlich Acetylmethylkarbinol aus Citronensäure und Brenztraubensäure, scheint jedoch nicht zu vermögen, diesen Stoff aus Zucker zu bilden. Die geringen Mengen von Acetylmethylkarbinol und Butylenglykol, die ich in einzelnen Fällen bei Zuckerumsatzversuchen mit *Streptococcus citrovorus* habe feststellen können (BÅNG 1945), sind möglicherweise auf andere Weise als durch einen direkten Zuckerumsatz zustande gekommen. Nach BÅNG (1947) kann *Streptococcus citrovorus* Citrat in Gegenwart von Zucker umsetzen.

Bekanntlich werden die Mikroorganismen im allgemeinen durch Produkte ihres eigenen Stoffwechsels in ihrer Entwicklung gehemmt. So werden die Milchsäurebakterien durch die von ihnen erzeugte Säure beeinflusst. Nach SVANBERG (1918) und VAN DAMM (1922) hemmt Milchsäure nicht nur durch ihren dissoziierten, sondern auch durch ihren nicht dissoziierten Teil, welcher letzterer wie ein Gift wirkt.

Aus vergleichenden Versuchen mit den zwei Modifikationen von *Streptococcus citrovorus*, —*aspirans* und *non aspirans I*—, betreffs ihres Verhaltens zu Äthylalkohol ergab sich, dass die äthylalkoholbildende Modifikation *non aspirans I* durch Äthylalkohol mehr in ihrer Entwicklung gehemmt wird als *aspirans*.

Die Untersuchungen wurden im Reagensglas mit 10 cm³ Nährsubstrat (Glukosebouillon + Hefewasser) ausgeführt. Die Züchtungstemperatur war für *aspirans* 20° C und für *non aspirans I* 37° C. Der Verlauf der Entwicklung wurde durch Titrierung der gebildeten Säure mit 0,1-n NaOH verfolgt. Siehe Tabelle E. Da die beiden Modifikationen verschieden grosse Gesamt-Mengen von Säure per Glukosemolekül bilden, können die erhaltenen Werte nur innerhalb einer jeden Gruppe mit einander verglichen werden.

Aus der Tabelle ist deutlich zu ersehen, dass bei Zusatz von 2 und 4 % Alkohol *non aspirans I* stärker als *aspirans* in seiner Entwicklung gehemmt wird.

Bei morphologischen Studien der beiden Modifikationen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Tab. E.

Kultur	Alkohol %	ml 0,1-n NaOH			
		Indikator Bromthymolblau (Umschlag nach grün)		Indikator Phenolphthalein (Umschlag nach rosa)	
		26/1	4/2	26/3	13/4
<i>Streptococcus</i>	—	3,33	3,50	4,41	4,49
<i>citrovorus</i>	0,2	3,10	3,52	4,41	4,34
<i>non aspirans I</i>	0,4	3,15	3,50	4,30	3,74
gezüchtet bei	2,0	1,28	2,00	2,11	0,01
37° C	4,1	0,00	0,00	0,55	0,02
<i>Streptococcus</i>	—	3,42	3,50	5,60	5,43
<i>citrovorus</i>	0,2	3,40	3,50	5,60	5,66
<i>aspirans</i>	0,4	3,40	3,50	5,50	5,70
gezüchtet bei	2,0	3,41	3,42	5,19	5,40
20° C	4,1	2,85	2,80	4,73	4,53

Nährsubstrat: 9 ml Glukose-Bouillon (2 %) + 1 ml Hefewasser.

Züchtung: 40 Stunden im Thermostat.

Diskussion

Aus dem oben Gesagten geht u. a. hervor, dass der Sauerstoffbedarf beim Zuckerabbau des heterofermentativen Milchsäurebakteriums *Streptococcus citrovorus* nach einer Züchtung bei 30° C geringer ist als nach einer solchen bei 20° C und grösser, als wenn die Züchtung bei 37° C erfolgt war. Nach einer Züchtung bei der letztgenannten Temperatur nimmt das Bakterium wenig oder gar keinen Sauerstoff aus der Luft auf. Es erhebt sich nun die Frage, ob der geringere Sauerstoffverbrauch nach einer Züchtung bei 30° C, verglichen mit dem nach einer Züchtung bei 20° C, darauf zurückzuführen ist, dass die einzelnen Bakterienzellen bei einer Züchtungstemperatur von 30° C weniger Sauerstoff für ihren Stoffwechsel bedürfen oder dass die zwei Modifikationen *aspirans* und *non aspirans I* bei dieser Züchtungstemperatur gleichzeitig in der Kultur zur Entwicklung kommen.

Aus mehreren Gründen neige ich der letzteren Alternative zu. Demnach sollten also bei einer Züchtungstemperatur von 30° C die beiden Modifikationen von *Streptococcus citrovorus* gleichzeitig in der Kultur zur Entwicklung kommen und der geringere Sauerstoffverbrauch nach einer Züchtung bei dieser Temperatur, verglichen mit dem nach einer Züchtung bei 20° C, darauf beruhen, dass ein grosser Teil der Bakterien nach der Züchtung bei 30° C aus der nicht sauerstoffverbrauchenden Modifikation (*non aspirans I*) besteht. Diese Auffassung stützt sich u. a. darauf, dass jede der beiden Modifikationen *aspirans* und *non aspirans I* ausgeprägt spezifische Eigenschaften aufweist. *Aspirans* kann im Gegensatz zu *non aspirans I* unter anaeroben Bedingungen, wenn kein H-Acceptor zugegen ist, Zucker nicht verbrauchen. *Non aspirans I* wird in seiner Entwicklung durch Alkohol mehr gehemmt als *aspirans*. Auch der Umstand, dass die Menge des gebildeten CO₂ stets gleich gross ist und nicht

den Veränderungen des Sauerstoffbedarfs der Kulturen folgt, lässt darauf schliessen, dass die beiden Modifikationen bei 30° C gleichzeitig zur Entwicklung kommen. (Dagegen ist die Geschwindigkeit der CO₂-Bildung bei den beiden Modifikationen nicht die gleiche.) Sollte die Schlussfolgerung, dass die beiden Modifikationen bei einer Züchtung bei 30° C gleichzeitig auftreten, nicht zutreffen, so würde dies bedeuten, dass sich der respiratorische Quotient des Bakteriums nach verschiedenen Richtungen hin verändern kann, was jedoch weniger wahrscheinlich sein dürfte. Im übrigen stützt sich meine Auffassung auf gewisse früher gemachte Beobachtungen hinsichtlich des Auftretens von Milchsäurestreptococcen in Milch (BÅNG 1940, CSISZÁR 1937 und DEMETER 1929).

Es wird oft davon gesprochen, dass Mikroben sich verschiedenen Nährsubstraten anpassen und je nach dem Nährsubstrat verschiedene Eigenschaften bei ihrer Entwicklung erwerben können. Vgl. z. B. *Azotobakter* mit Glukose und Mannit als Substrat (NILSSON 1936). Dies ist u. a. auch bei *Streptococcus citrovorus* der Fall. Bei Versuchen mit Bakterien-Suspensionen zeigt es sich, dass das Bakterium Citronensäure nicht verbrauchen kann, sofern es nicht auf einem Citronensäure enthaltenden Substrat gezüchtet worden war. Das Bakterium erwirbt also die Eigenschaft, Citronensäure umzusetzen, wenn es auf einem geeigneten Substrat, das u. a. diese Säure enthält, wachsen und sich entwickeln kann.

Ebenso wie das Nährsubstrat kann auch die Temperatur den Stoffwechsel des Bakteriums beeinflussen. Ein bei niedriger Temperatur (20° C) gezüchteter *Streptococcus citrovorus* weist nicht den gleichen Stoffwechsel auf wie ein solcher, der bei 37° C gezüchtet wurde. (Züchtungsdauer 24—36 Stunden.) Bei 20° C entwickelt sich eine sauerstoffverbrauchende, atmende, bei 37° C eine nicht atmende Modifikation des Bakteriums. Es ist bemerkenswert, dass sich bei 37° C auch unter den besten Sauerstoffverhältnissen die nicht atmende Modifikation von *Streptococcus citrovorus* bildet. Demnach ist die Temperatur der entscheidende Faktor, der bestimmt, ob sich die atmende oder die nicht atmende Modifikation des Bakteriums entwickelt.

Die Veränderungen des Sauerstoffbedarfs von *Streptococcus citrovorus* können möglicherweise mit den Verhältnissen bei der Entwicklung des Bakteriums in der Natur im Zusammenhang stehen. Dort kann sich *Streptococcus citrovorus* teils unter anaeroben Bedingungen als Darmbakterium (bei 37° C) bei Tier oder Mensch, teils in der freien Natur bei niedrigerer Temperatur (20° C) unter reichlicher Sauerstoffzufuhr auf Pflanzen und in Milch entwickeln.

Es sei bemerkt, dass ich habe feststellen können, dass auch das als homofermentativ angesehene Milchsäurebakterium *Streptococcus lactis* (OJ) seinen Stoffwechsel verändern und unter Einwirkung der Züchtungstemperatur heterofermentativ werden kann. Die Untersuchungen mit *Streptococcus lactis* sollen indessen in einer besonderen Arbeit behandelt werden.

Für die beiden hier behandelten Modifikationen von *Streptococcus citrovorus* — die atmende und die nicht atmende — sind die Zusatzbezeichnungen *aspirans* und *non aspirans* I benutzt worden. Da es vielleicht unnötig erscheinen mag, Bezeichnungen oder Namen dieser Art einzuführen, wenn es sich lediglich darum handelt, verschiedene Modifikationen ein und desselben Bakteriums zu bezeichnen, möchte ich an dieser Stelle ebenso wie in einer früheren Arbeit (BÅNG 1944) hervorheben, dass diese Bezeichnungen nur aus rein praktischen Erwägungen heraus benutzt worden sind, da sie die Behandlung des Stoffes in hohem Masse erleichtern. An und für sich brauchen und sollen Zusatznamen nur in ganz besonderen Fällen, wenn ihre Anwendung von praktischem Nutzen ist, eingeführt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus oben Gesagtem geht hervor, dass der Stoffwechsel des Aromabakteriums *Streptococcus citrovorus* (HAMMER) resp. *Betacoccus cremoris* [x Form] (ORLA—JENSEN) durch die bei der Züchtung des Bakteriums vorliegende Temperatur beeinflusst werden kann. Das Bakterium tritt, wenn es bei Körpertemperatur (37° C) gezüchtet wird, als nicht-atmender, wenn seine Züchtung bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (20° C) erfolgt, als atmender Mikroorganismus auf.

Der atmenden Modifikation von *Streptococcus citrovorus* wurde die Zusatzbezeichnung *aspirans*, der in dieser Arbeit beschriebenen nicht-atmenden die Zusatzbezeichnung *non aspirans I* gegeben. *Aspirans* geht ohne weiteres in *non aspirans I* über, wenn die Züchtungstemperatur auf 37° C erhöht wird. Bei einer Senkung der Züchtungstemperatur auf 20° C geht *non aspirans I* in *aspirans* über.

Versuche werden mitgeteilt, die den Abbau von Glukose durch die beiden Modifikationen beleuchten. Besonders ist die *aspirans*-Modifikation in dieser Hinsicht studiert worden. Der Sauerstoff kann hier durch gewisse Wasserstoff-Acceptoren ersetzt werden. Die Formelschemata 1-5 geben eine Übersicht der Ergebnisse.

Aus dem Wenner-Gren-Institut für experimentelle Biologie der Universität Stockholm.

LITERATUR-NACHWEIS. F. Bång, 1940, Kiel. Infolge des Krieges noch nicht gedruckt. — —, 1943, Svenska Mejeritidningen Nr. 35 S. 366. — —, 1944, Svenska Mejeritidningen Nr. 28 S. 318, Nr. 35 S. 370. — —, 1945, Svenska Mejeritidningen Nr. 36 S. 417. — —, 1937, Zentralbl. f. Bakt., II Abt. Bd. 95 S. 390 u. 449. — —, 1947, Noch nicht veröffentlichte Arbeit — K. Demeter, 1929, Milchw. Forsch. Bd. 8 S. 268. — J. Csiszár, 1937, Milchw. Forsch. Bd. 18 S. 68. — Van Damm, 1922, Opstulen over moderne zuivelchemie 2 Aufl. — B. W. Hammer, 1919, Agric. Exp. State Iowa Res. Bull. 55. — S. Knudsen u. A. Sørensen, 1929, Kgl. Veteri nær- og Landbohøjskoles Aarskrift S. 64. — R. Nilsson, 1936, Arch. f. Mikrobiologie Bd. 7 S. 611. — S. Orla-Jensen, 1943, Det Kongl. D. Videnskabernes Selsk. Abt. II Nr. 3 S. 65. — O. Svanberg, 1918, Diss. Stockholm.

Tryckt den 4 mars 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Genus specificity of the carbohydrate component in the sea-urchin egg jelly coat as revealed by paper chromatography

By ERIK VASSEUR and JANIS IMMERS

Mainly by using the orcinol and sulphuric acid reaction on carbohydrates (1) it was demonstrated that the major component of the sea-urchin egg jelly coat consists of a polysaccharide (2). This is esterified by sulphuric acid (2, 3). In the three sea-urchin species *Echinocardium cordatum*, *Paracentrotus lividus*, and *Strongylocentrotus droebachiensis* the chief repeating unit was shown to be fucose-sulphate. In *Echinus esculentus* jelly the monosaccharide was most probably galactose. In order to investigate the carbohydrate part more closely the present analyses were carried out.

Material and methods

The paper chromatography was performed according to PARTRIDGE (4). A mixture of butanol, acetic acid, and water was usually employed as the partition solvent and different Munktell filter papers were used.

The preparation of the jelly coat substance was according to VASSEUR (2). The *E. cordatum* jelly used was dialysed and concentrated by vacuumdistillation, but all the other preparations were precipitated with alcohol or alcohol and ether and dialysed. Afterwards the samples were freeze-dried. Hydrolysis was accomplished by heating the substance with 5 *N* sulphuric acid in a test tube (Hysil), provided with a rubber stopper, in a boiling water bath. By heating *E. esculentus* jelly substance for 5, 10, or 15 hours only one component was distinguished with silver nitrate and ammonia. Since the spot was weaker after 15 hours' hydrolysis than for the shorter heating times, 6 to 10 hours' hydrolysis was generally employed. After hydrolysis of the *P. lividus* jelly a large number of beautiful calcium sulphate crystals was found in the hydrolysate, indicating a high calcium content in this jelly (cf. 2).

Results

1. *Echinus esculentus*. Munktell No. 3.

Mannose, sorbose, arabinose, xylose, rhamnose, and fucose showed R_f values quite different from that of the hydrolysate, whereas the R_f values of glucose and galactose were very close to each other and to that of the hydrolysate. In order to distinguish between glucose and galactose it was found preferable to use very long experimental times. Then the border of the solvent passed the edge of the paper, but the difference

between glucose and galactose increased. In this way two spots were obtained with mixtures of glucose and galactose, and glucose and hydrolysate. Only one spot, however, was formed by a mixture of galactose and hydrolysate, situated at the same position as the spot for galactose and hydrolysate when tested separately. This clearly demonstrates that the carbohydrate component of *E. esculentus* jelly is built up of galactose and not of glucose or mannose, these three aldohexoses being the only possible monosaccharides according to the orcinol reaction (1, 2).

2. *Echinocardium cordatum*. Munktell OOM.

Substance	Length of migration, mm.	
Glucose	128	102
Galactose	109	89
Fucose	252	228
Hydrolysate.....	253	225

Only one spot was formed by the hydrolysate, situated at the same position as fucose.

3. *Paracentrotus lividus*. Munktell OOM.

Substance	Length of migration, mm.	
Glucose	55	90
Galactose	50	75
Fucose	135	217
Hydrolysate.....	{	55
		135
		89
		217

Two spots were formed, the lower one, corresponding to fucose, being the more intense. The upper spot was situated at the same position as glucose.

4. *Strongylocentrotus droebachiensis*. Munktell OB.

Substance	Length of migration, mm.		
Glucose	46	92	124
Galactose	35	75	106
Fucose	119	200	238
Hydrolysate.....	{	38	110
		118	198
			225

Two spots were generally formed, the more intense lower one corresponding to fucose, and the upper weaker one corresponding to galactose.

CONCLUSION AND SUMMARY

The different behaviour exerted by various jelly-coat substances when precipitated by ammonium sulphate and by alcohol and ether, demonstrates that the chemical composition is almost certainly different for these jellies (2). Moreover the analyses with paper chromatography indicate that the carbohydrate component of the sea-urchin jelly coat has a genus specific, perhaps even a species specific composition. Thus the polysaccharide part of the *Echinus esculentus* jelly seems to consist entirely

of galactose residues, and that of the *Echinocardium cordatum* jelly solely of fucose residues, whereas the *Strongylocentrotus droebachiensis* and the *Paracentrotus lividus* jelly substances contain mixed carbohydrate polymers, the former consisting of fucose and galactose and the latter of fucose and glucose, fucose being the dominating component in both jellies.

It is interesting to note in this connection that TYLER (5, 6) has found galactose in the jelly of *Strongylocentrotus purpuratus*.

For a more complete discussion the reader is referred to VASSEUR (7).

This work has been supported by grants from von Beskows stipendiefond and the doktorandstipendium of the Swedish Government.

From Wenner-Gren's Institute for Experimental Biology, University of Stockholm.

REFERENCES: (1) Vasseur, E., Acta Chem. Scand. 2, 693 (1948). — (2) ——— ibid. 2, 900 (1948). — (3) ——— Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 25 B, No. 6 (1947). — (4) Partridge, S. M., Biochem. J. 42, 238 (1948). — (5) Tyler, A., Physiol. Revs. 28, 180 (1948). — (6) ——— Anat. Record 101, 658 (1948). — (7) Vasseur, E., Arkiv Kemi 1, No. 14 (1949).

Tryckt den 5 mars 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Antigen-antibody reactions in gels

II. Factors determining the site of the precipitate

By ÖRJAN OUCHTERLONY

With 1 figure in the text

In the preceding paper (1) a diffusion method for analysis of precipitin reactions in agar gel was described, and some general observations concerning the nature of such reactions were noted. In model tests diphtheria toxin has been used as an antigen and diphtheria antitoxin as an antibody which, diffusing against each other in agar gel, under certain conditions form a streak-like, well defined specific precipitate. The present paper is an attempt to apply certain physico-chemical laws to this phenomenon.

It was previously noted that the site of the precipitate in relation to the diffusion centres, when other factors are constant, depends on the initial concentrations of the reactants. Furthermore, there is reason to suppose that the diffusion rate of the reactants is of decisive importance in this respect. These circumstances, together with the fact that the precipitate is sharp, almost edge-like, lead to the following assumption concerning the mechanism of the reaction. Precipitates are formed only where the concentrations of the components exceed certain critical threshold values and where at the same time their ratio has an optimal value. In other words the toxin-antitoxin complex should be easily soluble in an excess of either one of the two components and besides it should be distinctly although slightly soluble in the pure diffusion medium. One can therefore visualize the process as a migration of two critical concentrations against each other, the precipitate forming where these meet. The phenomenon might then be made the object of a mathematical analysis.

An important condition is that neither of the components is adsorbed on the gel, a phenomenon which would result in an anomalous diffusion. There seems to be no reason to consider this complication, however.

If the concentrations in the diffusion centres are constant and the diffusion takes place in one dimension only, Svedberg's diffusion equation could be applied:

$$(1) \quad \frac{C_x}{C_0} = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-y^2} dy$$

where $y = \frac{x}{2\sqrt{D \cdot t}}$. C_x denotes the concentration of the diffusing substance after the time t at the distance x from the border layer; C_0 the initial concentration, and D the diffusion coefficient of the substance.

Presuming the critical concentration expressed in FLU to be L , the initial concentration of antitoxin and toxin C_{AT} and C_T ; the distance of the precipitate from the two diffusion centres x_{AT} and x_T , and the diffusion coefficients D_{AT} and D_T , according to (1) the following formula is applicable.

$$(2) \quad L = C_{AT} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{y_{AT}} e^{-y_{AT}^2} \cdot dy_{AT} \right) = C_T \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{y_T} e^{-y_T^2} dy_T \right)$$

where $y_T = \frac{x_T}{2\sqrt{D_T \cdot t}}$ and $y_{AT} = \frac{x_{AT}}{2\sqrt{D_{AT} \cdot t}}$.

If the initial concentrations C_{AT} and C_T are equal, then $y_T = y_{AT}$, and from this follows

$$(3) \quad \frac{D_{AT}}{D_T} = \left(\frac{x_{AT}}{x_T} \right)^2.$$

According to this formula the relation $\frac{x_{AT}}{x_T}$ should be independent of the absolute value of the initial concentrations, as long as they are equivalent, and independent of the distance between the diffusion centres.

If the concentrations C_{AT} and C_T are not equal

$$(4) \quad \frac{D_{AT}}{D_T} = \left(\frac{y_T \cdot x_{AT}}{y_{AT} \cdot x_T} \right)^2$$

y_T and y_{AT} can be calculated only if the threshold value L is known.¹ A direct method for determination of this value is not known at present. By trial and error, however, it is possible to find the value of L that best fits a given series of observations, *i. e.* gives the smallest variations in the corresponding values of the ratio between the diffusion coefficients.

Details of the technique of the diffusion tests were given in the previous paper (1). The antigen used was crude diphtheria toxin concentrated through ultrafiltration and with a strength of 200 FLU/ml (CTN₂₀₀). Diphtheria immune serum (IS₂₀₀) obtained from a horse with an antitoxin strength of 200 FLU/ml was used as an antibody. Diffusion medium was SC-agar, *e. g.* water agar with 0.8 per cent sodium chloride, in an horizontal, plane-parallel layer where the reacting substances diffused against each other from rectangular parallel basins (35 mm in length), see (1) fig. 1 A. Readings were made as soon as the precipitates became visible.

The question is to what extent this experimental arrangement satisfies the above suppositions. If diffusion takes place in more than one dimension disturbances leading to curved precipitation lines could be expected. As a matter of fact such alteration are always observed at the lateral parts of the precipitation streak, the central part however forms a straight line. As long as the readings are made in the centre only,

¹ This calculation is easily done with use of tabulated values of the probability integral.

$1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-y^2} dy$. See *e. g.* (2).

one may calculate which one-dimensional diffusion with an allowable degree of approximation.

Measurements of the actual concentrations in the basins have shown a decrease of about 25% in 12 hours. As equation (1) requires constancy of initial concentration the conditions of the experiment in this respect are only a crude approximation to the ideal conditions set down in the theory. On this account certain reservations must be made regarding the reliability of the exact figures subsequently calculated.

Experiment 1. Equivalent concentration of toxin and antitoxin.

a) Concentrations varying between 200 and 1.6 FIU/ml (serial two-fold dilutions). Distance between the basins 20 mm.

With concentrations in the range of 200–25 FIU/ml a series of twenty tests was made, giving a mean value of 8.6 ± 0.3 mm for the distance of the precipitate from the serum basin.

With concentration 25 FIU/ml fifty tests were made giving a mean value of 8.5 ± 0.3 mm for the distance of the precipitate from the serum basin.

With concentrations in the range of 12.5–1.6 FIU/ml, finally, twenty observations gave a mean value of 8.6 ± 0.3 mm for the distance of the precipitate from the serum basin.

b) Concentration 25 FIU/ml. Distance between the basins 5, 10 and 20 mm. Each distance was tested in a series of twenty plates. The site of the precipitate was found to be 2.1 ± 0.27 , 4.2 ± 0.03 and 8.5 ± 0.09 mm respectively from the edge of the serum basin.

Experiment 1 shows that with equivalent concentrations of the reactants the ratio of the distance from the basins to the precipitate is constant and independent of the absolute values of the initial concentrations and the distance between the basins, in accordance with formula (2). The ratio $\frac{x_{AT}}{x_T}$ thus obtained corresponds to $\frac{D_{AT}}{D_T} = 0.56$.

Table 1.

Antitoxin FIU/ml	Toxin FIU/ml							
	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200
1.6	8.6	7.7	6.1	6.0	5.0	3.9	3.4	4.0
3.2	9.5	8.9	8.4	7.5	7.1	4.9	—	4.8
6.3	10.7	10.4	8.9	8.1	7.1	7.2	7.0	6.0
12.5	10.0	10.1	9.4	8.6	7.9	7.7	7.0	6.9
25	11.2	9.9	9.3	9.0	8.1	8.1	7.2	6.0
50	11.5	10.2	9.6	9.5	9.0	8.7	8.4	7.3
100	14.0	11.5	10.2	10.3	9.4	9.8	8.1	8.0
200	14.9	11.2	11.0	10.4	10.0	10.0	9.1	8.9

Experiment 2. Varying concentrations of toxin and antitoxin (200–1.6 FIU/ml). Distance between the basins 20 mm.

a) Table 1 gives the results of such a test. It is obvious that the higher the initial concentration of one component, all other conditions being constant, the farther away from the basin in question the precipitate appears.

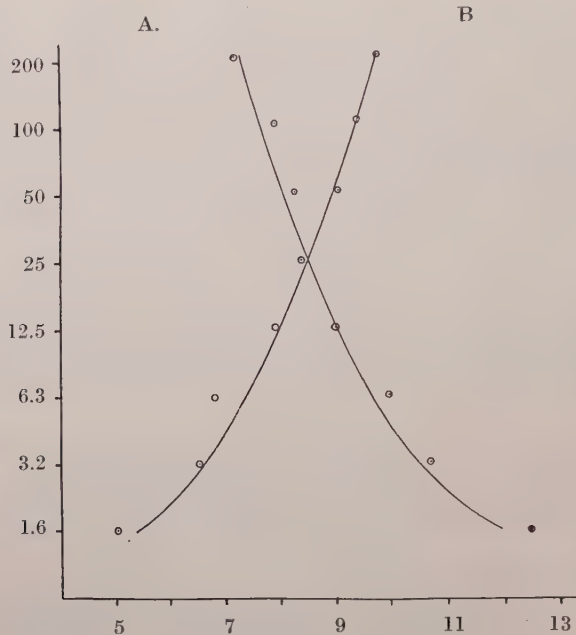


Fig. 1. The effect of varying concentrations of toxin and antitoxin on the site of formation of the precipitate.

Abscissa: distance of precipitate in mm from serum basin.
 Ordinate: FIU/ml (log. scale) of initial concentration.
 A = constant antitoxin concentration of 25 FIU/ml.
 B = constant toxin concentration of 25 FIU/ml.

Table 2.

Antitoxin and toxin resp. FIU/ml	Toxin 25 FIU/ml		Antitoxin 25 FIU/ml	
	Distance of precipitate from the antitoxin basin	D_{AT}/D_T for $L = 0.35$ FIU/ml	Distance of precipitate from the antitoxin basin	D_{AT}/D_T for $L = 0.35$ FIU/ml
200	9.7	0.55	7.2	0.52
100	9.4	0.56	7.9	0.60
50	9.1	0.58	8.3	0.61
25	8.4	0.52	8.4	0.52
12.5	7.9	0.54	9.0	0.53
6.3	6.8	0.44	10.0	0.60
3.2	6.5	0.56	10.5	0.51
1.6	5.0	0.46	12.5	0.68

$$\frac{D_{AT}}{D_T} \text{ for } L = 0.35 \text{ FIU/ml, } M = 0.55 \pm 0.04.$$

b) In two further test series toxin of constant strength — 25 FIU ml — was set up against varying strengths of antitoxin 200–1.6 FIU/ml and vice versa. The results are shown in table 2 and graphically in fig. 1. The figure shows that when the site of the

Table 3.

<i>L</i> in FIU/ml	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
Mean value of the ratio D_{AT}/D_T ..	0.56	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.56	0.55	0.55
Standard deviation	0.10	0.08	0.06	0.05	0.05	0.04	0.05	0.06	0.06

precipitate is plotted against log. initial concentration the two curves obtained intersect in a point corresponding to 25 FIU/ml (8.4 mm from the serum basin and 11.6 mm from the toxin basin).

On the basis of experiment 2 b) the ratios $\frac{D_{AT}}{D_T}$ were calculated according to formula (4) for different values of *L*. (On account of the uncertainty of the readings for 1.6 FIU/ml these values were excluded in the calculation.) Table 3 shows for each value of *L* the corresponding mean of $\frac{D_{AT}}{D_T}$ and its standard deviation (σ) from the whole experiment. For *L* = 0.35 FIU/ml, corresponding to $\frac{D_{AT}}{D_T} = 0.55$ σ is minimal. The curves of fig. 1 are based on this value.

In the literature the diffusion coefficient of diphtheria toxin in water is given as $D_{20} = 6.0\text{--}6.2 \times 10^{-7}$ cm²/sec. (3, 4). As for the antitoxin the figures vary (3, 4, 5, 6). $D_{20} \times 10^7$ has been determined to be 3.9–4.4 for the antitoxic pseudoglobulin fraction of immune serum from horse, 5.0 for antitoxin dissociated from toxin-antitoxin floccules, and 5.8 for pepsin digested antitoxin. Accordingly the ratio $\frac{D_{AT}}{D_T}$ for non-treated antitoxin should be 0.63–0.73. The values calculated from experiments 1 and 2 (0.56 and 0.55) deviate significantly from the figure quoted. The discrepancy can scarcely be caused by the fact that the present experiments were carried out at 37° whereas the diffusion coefficients quoted refer to 20°. Temperature correction would influence D_{AT} and D_T to the same extent leaving their ratio unchanged. On the other hand the difference between free diffusion and diffusion in gel must be taken into consideration. No doubt the gel retards the diffusion of large molecules, the degree of retardation increasing with the size of the molecules. In gel diffusion, therefore, one should expect the difference in molecular size between toxin and antitoxin to lower the ratio D_{AT} , as, in fact, was found in the experiments.

SUMMARY

On the assumption that immune precipitates appear where migrating critical concentrations of toxin and antitoxin meet, the ratio of their diffusion coefficients can be calculated when the site of the precipitate is known. In accordance with the theory it was found that with equivalent initial concentrations the ratio of the distances of the precipitate from the diffusion centers was constant, independent of the absolute values of the initial concentrations and independent of the distance between the diffusion centers. On the basis of this observation the ratio of the diffusion coefficients

$\frac{D_{AT}}{D_T}$ was calculated to be 0.56. In experiments where the initial concentrations were not equivalent the critical concentration for the appearance of the precipitate was calculated to be 0.35 FIU/ml and the corresponding ratio $\frac{D_{AT}}{D_T}$ to be 0.55.

The State Bacteriological Laboratory and the Bacteriological Department at Södersjukhuset, Stockholm, Sweden.

REFERENCES. 1. **Ouchterlony, Ö.**, Arkiv för kemi, mineralogi och geologi, Bd 26 B, No 14, 1948. — 2. e. g. **Mellor**, Higher Mathematics, Fourth Edition p. 621, table X. — 3. **Lundgren, H.**, **Pappenheimer, A. M.**, **Williams, J. W.**, J. Am. Chem. Soc. 61, 533, 1939. — 4. **Pappenheimer, A. M.**, **Peterman, M. L.**, J. Phys. et Chem. 45, 1, 1941. — 5. **Northrop, J. H.**, J. Gen. Physiol. 25, 465, 1941. — 6. **Rothen, A.**, Ibid. 25, 487, 1941.

Tryckt den 4 mars 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Studies on the Freund—Kaminer reaction

I. Methods

By HANS v. EULER, LEO HELLER and

CHRISTINA CURMAN

In March, 1910, E. FREUND and G. KAMINER (1) presented before the Vienna Medical Society a first paper on their inquiry into the action of carcinomatous and non-carcinomatous serum respectively on tumour cells. They summarized their results in the following two statements:

- A. The serum of non-carcinomatous individuals destroys carcinoma cells, but leaves the organ cells of both carcinomatous and non-carcinomatous individuals unchanged.
- B. The serum of carcinomatous individuals does not destroy carcinoma cells, but leaves the organ cells of both carcinomatous and non-carcinomatous individuals unchanged.

The question, whether and under what conditions these two statements are valid, is evidently of essential importance to an understanding of the inception and growth of cancer tissue.

FREUND and KAMINER, in their above-mentioned paper, as well as in their monograph, "Biochemical Basis of Cancer Predisposition" (1925), and in their subsequent works, endeavoured to give a chemical interpretation of their two basic experimental results. They postulated, and claimed to have experimentally tested, hypotheses to the effect that the action of non-carcinomatous serum is exerted through a substance which is not dialyzable, precipitates in alcohol, is destroyed if heated to 55° C, is ether soluble, and after de-etherization soluble in alcohol; and further, that the ether extract of the cancer serum contains no destructive substance, but on the contrary, a component which counteracts the cytolytic action of normal serum.

In the great majority of tests carried out so far in re-investigation, the above-mentioned hypotheses concerning the cell destructive and cell protective substances were taken into account. However, we would emphasize at once that the fundamental validity of the FREUND—KAMINER cancer diagnosis depends neither on the existence of the active and protective substances assumed to explain it, nor on the assumption of the splitting of a lipoid that can be extracted from the cells (2).

For a final clarification of the much discussed question as to the value of the FREUND—KAMINER diagnostic principle, it will be advisable to draw a clear distinction between the confirmation of experimental, non-hypothetical basic results of these investigators and criticism of the testing method and the attempts at a biochemical interpretation. Even though this or that seeming confirmation of the

FREUND-KAMINER reaction fails to stand a reexamination, this does not prove that the starting point of the reaction is invalid.

Thus, though according to the experiments reported below the results obtained with the method of WILLHEIM and STERN (2) (3) constitute no proof of the reliability of the FREUND-KAMINER reaction, it should be taken into account that while FREUND's and KAMINER's observation concerning the lysis of cancer cells by normal serum may be correct, the experimental evidence hitherto afforded seems not to be sufficient to support the hypothesis that the different behaviour of normal and cancerous serum is caused by the intervenience of substances activating or inhibiting lipolysis.

There are only a few control investigations according to which the FREUND-KAMINER reaction can be used for diagnostic purposes. But several authors, including WATERMAN (4) and WILLHEIM-STERN (6), confirm FREUND-KAMINER's basic observation. We will discuss the very extensive and exact investigations of WATERMAN in a following paper.

FREUND-KAMINER carried out their experiments in the following manner: They incubated a tumour cell suspension with normal serum at 40° for 24 hours, then counted the destroyed cells in the usual Thoma-Zeiss haemocytometer. WILLHEIM and STERN emphasized the difficulty of obtaining exact values for the destroyed cells and therefore considered that an "objectivation" of the FREUND-KAMINER reaction was necessary.

The method, elaborated by WILLHEIM and STERN for their control experiments, was based on the observation that the cytolysis in the serum is correlated with an increase of lipoids (5). For the determination of the amount of lipoids freed during cytolysis they used *neutral red* according to E. ALBRECHT. They removed the solid cell particles by centrifuging both the experimental solution and a control proof mixing 1 ml of serum with 0.1 ml of a solution of 1 per cent neutral red.

They added varying amounts of serum to the suspension of carcinomatous cells and measured the rate of cytolysis. The graphs, thus obtained, representing cytolytic values for the various mixtures showed essential differences.

In a subsequent investigation WILLHEIM and STERN carried out their experiments with a lipid extract, in accordance with a method described in *Biochem. Z.* 1930/31 (2, 3).

In the same year WILLHEIM and STERN made the following report on the diagnostic value of the FREUND-KAMINER method:

Sera	Total number of cases investigated	Erraneous results
Cancerous.....	138	22 = 15.9 per cent
Normal (non cancerous)	180	21 = 11.7 per cent

Similar results, also based on an assumed lipolytic mechanism of the carcinolytic reaction, were obtained by another investigator, who applied interferometry in studying the action of serum on alcoholic tumour extracts (8).

These apparently very encouraging data, which appeared to support the assumption of a lipolytic character of the FREUND-KAMINER phenomenon, called aloud for further investigation and control. The present paper records an attempt to test the general validity of the lipolytic hypothesis of STERN and WILLHEIM. We

used animal tumour extracts and corresponding homologous sera instead of the human tumours and sera used by STERN and WILLHEIM (3) as well as by METTENLEITER (5).

In this connection we wish to emphasize that studies with cell suspensions from *animal tumours* have led several authors in previous investigations (we mention only R. KRAUS and E. v. GRAFF (8) and J. FLASZEN a. H. WACHTEL (9)) to interesting results (11).

Experimental

In accordance with WILLHEIM and STERN we carried out our experiments with lipid-extracts, which we prepared as follows:

Extraction of lipoids. A quantity of liver tissue was extracted three times with acetone, then dried in an exsiccator, ground, shaken for 3 hours with ether and centrifuged. The solid residue was then treated for 3 hours with alcohol, the alcoholic extract being separated from the residue by centrifuging. In some experiments we used the ether and the alcoholic extracts separately, in other experiments we used the same quantities of the mixed total lipid extract.

Procedure. The same quantity of lipid extract (0.7–1.9 mg dry weight) was added to all test tubes and evaporated at 37°. Increasing volumes of serum were then added to each series of experiments (generally 0.5–1.5 ml). There were 3 tubes in each series. The tubes were placed in a thermostat at 37° for ca 18 hours and more serum was added, until the total volume was 2 ml in each tube. The solutions were filtered and determined in one of two different ways: either colorimetrically in a photometer after addition of 0.4 ml solution of 0.25 per cent neutral red per ml serum, or by measurement in an interferometer.

Results

A. Colorimetric determination of lipolysis with neutral red

Series 1.

Substrate: Alcoholic extract from transplanted benzpyrene rat sarcoma prepared according to STERN and WILLHEIM (3).

In a number of test tubes 0.10 ml substrate (= 0.77 mg dry weight) was evaporated to dryness in an incubator at 37° C. Serum was added (0.5, 1.0 and 1.5 ml

Table 1.

Quantity of Serum Added	Serum from	Extinction Values for Experiment Nr		
		I	II	III
0.5 ml	normal rat	0.244	0.185	0.087
1.0		0.318	0.125	0.080
1.5		0.342	0.223	0.153
0.5	sarcomatous rat	0.526	0.162	—
1.0		0.755	0.189	—
1.5		0.888	0.121	—

resp.) and the test tubes were incubated at 37° for 18 hours. After cooling the tubes down to room temperature and filling up the first two test tubes (containing resp. 0.5 and 1.0 ml serum) with the same serum to a volume of 1.5 ml, we added the neutral red solution and measured the extinctions in a Zeiss-Pulfrich Stufen-photometer (Filter S 47), using 0.5 cm cuvettes. The readings were performed against the same serum, incubated together with the samples but containing no lipid. The results are summarized in the following Table.

Series 2.

Substrates: fractionated tumour lipids:

- ether fraction (0.3 ml = 1.89 mg dry substance per test tube)
- abs. alcohol fraction (0.45 ml = 1.89 mg dry subst.)
- total lipid (acetone, ether and alcohol extracts pooled)
(0.8 ml = 1.92 mg dry subst.)

Procedure as in series 1.

Table 2.

Fraction	Quantity of Serum Added ml	Serum from	Extinction Values for Experiment No		
			I	II	III
Ether extract	0.5	normal rats	0.045	—	0.030
	1.0		0.110	-0.040	0.025
	1.5		0.005	-0.290	0.073
Alcoholic extract	0.5		0.070	-0.016	0.080
	1.0		0.035	-0.023	0.015
	1.5		—	-0.048	-0.042
Total lipids	0.5		0.090	0.000	-0.033
	1.0		0.085	0.030	0.018
	1.5		0.095	-0.010	0.010
Ether extract	0.5	sarcomatous rats	-0.025	0.000	0.039
	1.0		-0.010	-0.012	0.070
	1.5		-0.125	-0.150	0.112
Alcoholic extract	0.5		0.005	-0.025	0.034
	1.0		0.030	0.010	-0.015
	1.5		-0.022	—	-0.006
Total lipids	0.5		0.055	—	0.048
	1.0		-0.030	—	0.020
	1.5		0.005	—	0.018

B. Interferometric determinations

Substrates: As in a) series 2. Apparatus: Portable "Zeiss" interferometer for liquids.

Cuvettes: As the 1.0 mm microcuvettes yielded no measurable readings, we tried to use 1.0 cm normal cuvettes. The readings thus obtained must be considered as only approximatively exact, owing to the relatively strong extinction of the sera for transmitted light, which made the interference bands dark and rather undistinct. The readings were again taken against the same, previously incubated serum.

The results of the interferometric determinations are summarized in Table 3.

Table 3.

Fraction	Quantity of Serum Added	Interferometer Readings			
		Normal Rat Serum		Sarcomatous Rat Serum	
		I	II	I	II
Ether extract	0.5 ml	-121 (-254)	243	458	-84
		68 (64)	185	394	92
		43 (31)	76	383	154
Alcoholic extract . . .		70	305	761	99
		191	171	493	177
		99	257	—	220
Total lipid		78	571	283	212
		112	326	426	143
		90	290	371	112

Besides the colorimetric and interferometric measurements recorded in the tables 1-3, a series of analogous experiments has been carried out by the same methods. The readings after the incubation with normal and with sarcomatous rat serum showed no regular differences. In several cases we observed a maximum of extinction in solutions containing 1.0 ml serum per 1 mg of dry lipid weight, which approximately corresponds with the data, regarded as characteristic for tumour by STERN and WILLHEIM. But we obtained similar maxima with either sarcomatous or normal serum.

The absolute extinction values showed no constancy. They were in some cases higher for sarcomatous serum, in other cases higher for normal serum. The examination method proposed by WILLHEIM and STERN involves inevitable irregularities (13).

It might be objected that FREUND and KAMINER found their basic phenomenon on human serum and cancer tissues but not on animal sarcomata, which essentially differ from the human cancer tissue. However, in studies of the quantitative reproducibility of FREUND-KAMINER's effect as measured by their own or other proposed methods (12), experiments with animal material provide the favorable possibility of choosing a completely comparable biological material derived from the same strain and therefore, of avoiding individual differences.

Our experiments reported here *give no indication for the existence of regular and reproducible differences between the respective lipolytic action of normal and cancerous sera on lipid extracts of tumours.*

Independently of this negative result, relating to the WILLHEIM-STERN method, based on a *special hypothesis* of FREUND-KAMINER, the basic observation of the Austrian authors may be correct.

It would therefore be desirable to undertake an extensive study on the chemical nature of FREUND-KAMINER's cytolytic reaction, but with a substrate less unstable and less difficult to prepare than the cancer cells from liver metastases. The most suitable material for new experiments on the validity of FREUND-KAMINER's

reaction and on the chemical processes upon which it is based (10), seem to be *suspensions of ascites-carcinoma cells* from mice.

In the opinion of FREUND-KAMINER, cancer cells contain a substance which protects them against the lipolytic action of normal serum. A. v. CHRISTIANI claims to have identified this substance as cholesterolbutyrat. The lowmolecular nature of this ester seems to preclude that FREUND's basic phenomenon has the character of a serological antibody-reaction, in which case we should be able to test it, using a heterologous serum. We hope to discuss this point in a future paper.

We wish to gratefully acknowledge a grant from the FREDERICK F. A. PEARSON FOUNDATION to one of us (H. v. E.).

REFERENCES. (1) E. Freund and G. Kaminer, Wien. klin. Wochenschr. 1910 Nr. 10. Biochem. Z. 26, 312 (1910). Wien. klin. Wochenschr. 46, 1576 (1933). E. Freund, Metabolic Therapy of Cancer. London, D. Godwin. Translated by Lawrence Wolfe. — (2) R. Willheim u. K. Stern, Biochem. Z. 226, 315 (1930). — (3) K. Stern u. R. Willheim, Biochem. Z. 239, 473 (1931). — (4) N. Waterman u. L. de Kromme, Biochem. Z. 182, 377 (1927). — (5) M. W. Mettenleiter, Bol. liga contra el cancer 13, 165 (1938). Nature (London) 145, 305 (1940). — (6) K. Stern and R. Willheim, The Biochemistry of Malignant Tumors, New York 1943, p. 829. — (7) R. Willheim u. K. Stern, Wien. klin. Wochenschr. 1931, Nr. 23. Compare E. Ebner, F. Mandl and G. Pich, Wien. klin. Wochenschr. 1932, Nr. 1. — (8) R. Kraus u. E. v. Graff, Wien. klin. Wochenschr. 24, 191 (1911). — (9) J. Flaszen u. H. Wachtel, Klin. Woch. 15, 684 (1936). — (10) C. Neuberg, Biochem. Z. 26, 344 (1910). — (11) H. Auler could not state advantages of such investigations (Neue Deutsch. Klinik 5 Erg. B (1927). — (12) Studies with cells from metastase-free Organs of cancer patients: K. Bauer, Wien. klin. Wochenschr. 48, 1409 (1935). 49, 266 (1936). R. Königstein u. R. Willheim, Biochem. Z. 292, 275 (1937). — (13) Negative colorimetric results: G. Perazzo, Tumore 13, 177 (1939). P. Rondoni, Il Cancro (Milano 1946).

Tryckt den 4 mars 1949.

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Antigen-antibody reactions in gels

III. The time factor

By ÖRJAN OUCHTERLONY

With 1 figure in the text

In preceding papers (1, 2) the author has described a diffusion method for the study of precipitin reactions in agar and has attempted to apply some physico-chemical laws to reactions of this kind. The present paper presents further analysis of the physico-chemical basis of the diffusion method with particular reference to the time relationships.

As has been shown before the site of the precipitation line, which appears in the agar when antigen and antibody diffuse against each other, is dependent on the initial concentrations of the components in the diffusion centres. If these concentrations are made equivalent the precipitation line divides the distance between the centres in a fixed ratio, independent of the absolute values of the initial concentrations and independent of the distance between the diffusion centres. Under such conditions the precipitate remains stationary on continued diffusion of the reactants. If, on the other hand, the initial concentrations are not equivalent the precipitate first formed is gradually displaced (1, fig. 2 D) by successive dissolution and reprecipitation in connection with changes in the concentrations of the components in the precipitation zone.

It may be suspected that a reaction time corresponding to the flocculation time in tube flocculation occurs in precipitin reactions in agar, i. e. that a certain time is required before a precipitate becomes visible after the establishment of optimal conditions for its formation. If this is the case the following situation may be imagined. At a certain moment the diffusing substances have attained at one point the critical concentrations for a precipitation. Here the precipitation begins, although no visible precipitate appears immediately. The reactants diffuse into the precipitation zone from both sides and their concentrations increase continuously. If the initial concentrations in the diffusion centres are not equivalent the concentration of the components will increase with unequal rapidity in the precipitation zone, i. e. the optimal conditions for precipitation will be disturbed. The consequence is that the visible precipitate is first formed at a place different from the point where the process started. It is, however, this latter point that is of importance in a mathematical analysis of the diffusion. Even in experiments set up with equivalent initial concentrations where the precipitate remains stationary the reaction time must be important in studies concerning the time relationships. The length of the reaction time is partly dependent on the diffusion rates, i. e. on the initial concentrations and the

distance between the basins. Thus, the reaction time must be expected to increase with increasing distance between the diffusion centres. The exact type of this relationship can hardly be foreseen. It is probable though that the ratio of the reaction time to the time required for the establishment of the critical concentration (diffusion time) will not remain constant when the distance is varied. Therefore, diffusion coefficients calculated from the time required for the appearance of a visible precipitate will most probably vary with the distance between the diffusion centres, other factors being kept constant.

Experiment 1. Equivalent concentrations of toxin and antitoxin, 25 FIU/ml. Distance between the basins 3, 5, 10 and 20 mm.

Each distance was tested in ten experiments. Place and time for the formation of visible precipitate were recorded. The distance of the precipitate from the edge of the serum basin was 1.3, 2.1, 4.2 and 8.5 mm and the time required for formation of visible precipitates 1.9, 3, 10 and 41 hours respectively.

In the preceding paper in this series SVEDBERG's diffusion equation was judged to be applicable

$$(1) \quad \frac{C_x}{C_0} = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-v^2} \cdot dy$$

where

$$(2) \quad y = \frac{x}{2\sqrt{D \cdot t}}$$

C_x denotes the concentration of the diffusing substance after the time t at the distance x from the border layer, C_0 the initial concentration and D the diffusion coefficient of the substance.

In experiment 1 $C_0 = 25$ FIU/ml and the values of x are determined. For an estimation of D , C_x and t must also be known. C_x is the critical concentration, previously denoted as L and determined to be 0.35 FIU/ml (2). If t_r denotes the reaction time, the time required for the appearance of a visible precipitate, T , will be

$$(3) \quad T = t + t_r.$$

Inserting T for t in (2) will give a value of D that is too low. This calculation performed with the data from experiment 1 leads to the following values of the diffusion coefficient of diphtheria toxin, D_T , viz. 3.5, 6.4, 7.7 and 7.4×10^{-7} for the distances 3, 5, 10 and 20 mm. It is impossible to tell whether this series indicates the existence of a maximum for the distance 10 mm or a continuous increase towards an upper limit. In any event, however, it proves the reality of the reaction time.

The diffusion coefficient of antitoxin D_{AT} corresponding to $D_T = 7.4 \times 10^{-7}$ cm²/sec. is calculated in the same way to 4.0×10^{-7} cm²/sec. In the literature (3, 4, 5) $D_{20} \times 10^7$ cm²/sec. for diphtheria toxin is given as 6.0–6.2 and for diphtheria antitoxin as 3.9–5.0 which, with correction for temperature, gives D_{37} for the toxin 8.8–9.1 and for the antitoxin 5.7–7.4 $\times 10^{-7}$. The differences between these values and the diffusion coefficients, calculated from precipitation experiments in gel, may — as is

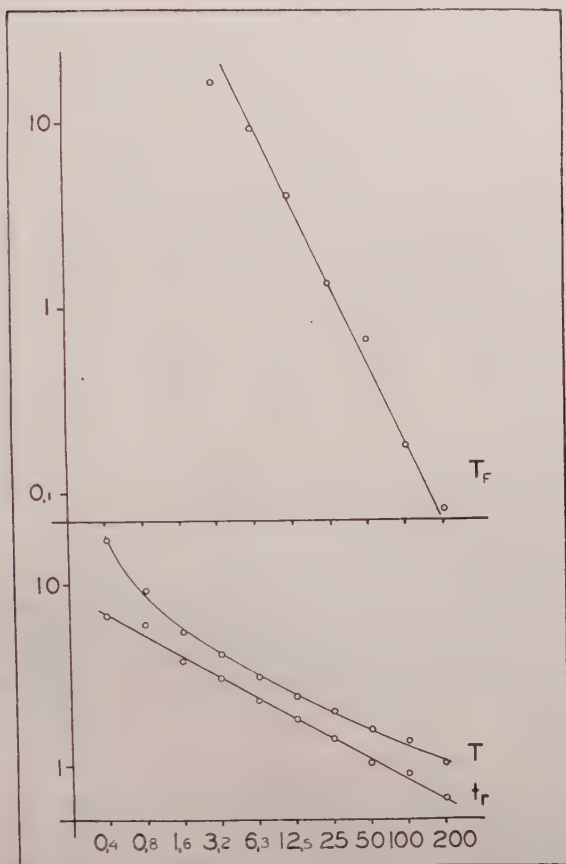


Fig. 1. The comparison between flocculation time and time for appearance of precipitate in a gel.

Abscissa: FIU/ml (log. scale) of initial concentration of toxin and antitoxin.

Ordinate: Time in hours (log. scale).

T_F = tube flocculation

T = gel precipitation

t_r = gel precipitation corrected for diffusion time.

already mentioned in the previous paper — be attributed to the circumstance that the gel retards the diffusion of large molecules.

In studying the relation between initial concentration and reaction time we will first consider the time-concentration relationship of tube flocculation reactions. According to HOOKER and BOYD (6) the log. of the flocculation time varies rectilinearly with the log. of the concentration. This statement was tested in the following experiment.

Experiment 2. Equivalent varying strengths of toxin and antitoxin flocculated in tubes — “Primo-flocculation de Ramon”.

In this experiment so-called Vidal tubes 9 mm diameter were used and the experiment was made in a 37° thermostat. Before the experiment, tubes, pipet-

Table 1.

Concentration of toxin and antitoxin FIU/ml	T_F	T	$L = 0.10$ FIU/ml		$L = 0.20$ FIU/ml		$L = 0.30$ FIU/ml	
			t	t_r	t	t_r	t	t_r
200	0.08	1.0	0.4	0.6	0.5	0.5	0.6	0.4
100	0.18	1.3	0.5	0.8	0.6	0.7	0.6	0.7
50	0.68	1.5	0.6	0.9	0.7	0.8	0.7	0.8
25	1.37	1.9	0.7	1.2	0.8	1.1	0.8	1.1
12.5	4.07	2.3	0.8	1.5	0.9	1.4	1.1	1.2
6.3	17.5	3.0	0.9	2.1	1.2	1.8	1.4	1.6
3.2	—	4.0	1.2	2.8	1.6	2.4	2.0	2.0
1.6	—	5.3	1.6	3.7	2.3	3.0	3.2	2.1
0.8	—	9.0	2.3	6.7	4.2	4.8	6.9	2.1
0.4	—	17.0	4.2	12.8	11.8	5.2	51.4	—34.4
0.2	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1	—	—	—	—	—	—	—	—

The figures of T , t , t_r and T_F are given in hours.

tes and reagents had been brought to the same temperature. Toxin and antitoxin of equivalent but varying strengths 200–3.2 FIU/ml (serial twofold dilution) were mixed in quantities of 2+2 ml in each tube and the time T_F for formation of visible floccules was registered. In table 1 the mean values of T_F from a series of six tests can be found. In fig. 1 the relation between $\log C$ and $\log T_F$ is expressed graphically. The approximation to a straight line is satisfactory.

Attempts were made to study the corresponding phenomena in ring flocculation tests, more closely resembling the conditions prevailing in gel reactions. These experiments were unsuccessful due to the difficulty in determining the exact time of the appearance of precipitates.

The following experiment finally was designed for the study of reaction time in gel precipitin reactions.

Experiment 3. Equivalent, varying strengths of toxin and antitoxin in parallel basins at 3 mm distance from each other.

In this experiment concentrations in the range of 200–0.1 FIU/ml were tested. Appearance, place and time for formation of visible precipitate were recorded. Readings were made every 15 minutes during the first few hours, later every 30 minutes, every hour and finally every 12 hours. The total observation time was ten days. In table 1 the times required for the formation of a visible precipitate are recorded, each figure being the mean of four observations. The distance of the precipitate from the basin containing toxin was 1.7 mm. With the initial concentrations 0.2 and 0.1 FIU/ml no precipitates appeared within the observation time. In fig. 1 $\log T$ is plotted against $\log C_0$.

The calculation of the reaction times t_r is possible if the diffusion time t can be estimated, see formula (3). In order to compute t the diffusion coefficients and the critical threshold concentrations $C_x (= L)$ must be known. As a possible value of D_T , 7.5×10^{-7} cm²/sec. may be chosen in accordance with experiment 1. L was pre-

viously calculated as 0.35 FIU/ml but as the present experiment was performed with a different lot of toxin it was thought advisable not to use this value. Instead different values of L were tested. In table 1 are shown values of t and t_r corresponding to $L = 0.10, 0.20$ and 0.30 FIU/ml. It is immediately evident that the assumption that $L = 0.30$ leads to absurd values of t_r . At the present time it is impossible to choose the proper alternative from any of the remaining series of figures. It will be noted however that when $L = 0.20$ there results a series of t_r values, the logs of which fall on a straight line when plotted against the logs of initial concentration. The corresponding L value is probable per se, as the non-appearance of a precipitate when the initial concentrations below 0.4 FIU/ml were used indicates a threshold value of this order of magnitude.

In spite of the approximations made in this analysis the method seems to offer a possibility for a study of the reaction time.

SUMMARY

An analysis of the time relationships in gel precipitin reactions has indicated that after the establishment of the necessary conditions for precipitation a certain time is required before the precipitate is visible. Methods for a study of this phenomenon have been outlined and with due consideration of the time factor the diffusion coefficients of diphtheria toxin and antitoxin were estimated tentatively at 7.5 and $4.0 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec. respectively, figures referring to diffusion in agar at 37° .

The State Bacteriological Laboratory and the Bacteriological Department at Södersjukhuset.

Stockholm, Sweden.

REFERENCES. 1. **Ouchterlony, Ö.**, Arkiv för kemi, mineralogi och geologi Bd 26 B, No. 14, 1948. — 2. — Arkiv för kemi Bd 1, No. 7, 1949. — 3. **Lundgren, H., Pappenheimer, A. M., Williams, J. W.**, J. Am. Chem. Soc. 61, 533, 1939. — 4. — J. Exptl. Med. 71, 274, 1940. — 5. **Pappenheimer, A. M., Peterman, M. L.**, J. Phys. et Chem. 45, 1, 1941. — 6. **Hooker, S. B., Boyd, W. C.**, J. Gen. Physiol. 19, 373, 1935.

Tryckt den 4 mars 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Some physico-chemical experiments on fractions of dextran

By B. INGELMAN and M. S. HALLING

With 10 figures in the text

In previous papers (1-23) descriptions have been given of the breakdown of the very high molecular polysaccharide dextran to a substance with lower molecular weight by means of partial hydrolysis. Dissolved in physiologic saline, this substance has been widely used medically as a plasma substitute. Complete acid hydrolysis gives glucose as the final breakdown product. Thus dextran, as starch and cellulose, has the chemical formula $(C_6H_{10}O_5)_n$. Dextran and its partially degraded products are polymolecular, i. e. consist of molecules with the same chemical composition but with different molecular weights. Therefore the number n in the above formula can vary within a rather large range for the molecules of a dextran preparation.

The fractionation experiments described in this paper have been made in order to investigate the possibility of getting a dextran preparation more homogeneous in respect to the size of the molecules. Such a preparation will have great advantages from a medical point of view. Furthermore it is of interest to get homogeneous dextran fractions for physico-chemical investigations. The possibility of using fractions in order to study the distribution of molecular weights in partially hydrolyzed dextran preparations is of great importance, but will not be considered in this paper. This question will be treated in connection with planned adsorption experiments. CLAESSON (24), using an improved technique in adsorption analysis, recently has discussed the advantages which this method offers in determining the distribution of molecular weights of polymolecular colloids.

The usefulness of dextran as a plasma substitute is highly dependent upon the size of the dextran molecules. Unhydrolyzed or only slightly hydrolyzed dextran infused intravenously will cause injurious reactions. However, dextran broken down to a molecular size of the same order of magnitude as that of the plasma proteins is quite harmless. In producing a plasma substitute from dextran it is necessary to interrupt the hydrolysis at such a stage that the main part of the dextran molecules will have a molecular weight which enables them to stay for some time in the blood-vessels and not to be immediately filtered away through the glomerular membranes of the kidneys or through the walls of the blood-capillaries. On the other hand the molecular weight has to be low enough to give a high colloidal osmotic pressure. As the injurious reactions are caused by the largest dextran molecules, it is desirable for these molecules to be absent from the plasma substitute. Furthermore the purification of the partially hydrolyzed dextran is more easily accomplished after a more intense hydrolysis. Unhydrolyzed dextran considerably enhances the sedimentation tendency of the red blood-corpuscles. The higher the degree of degradation the less

is this action. This has also been confirmed by HINT and THORSÉN (25) in experiments with fractions of dextran carried out at the same time as the fractionation experiments described below. They found a pronounced increase in sedimentation rate of the erythrocytes with increasing molecular weight. (The dextran fractions were characterized by means of viscosity and osmotic measurements.) The experiments have shown that the action of therapeutically used dextran on the sedimentation rate of the red blood-corpuscles is mainly due to the largest molecules in the polymolecular dextran.

The partially hydrolyzed dextran hitherto used for medical purposes has answered all the demands which can be required of a plasma substitute. By performing a fractionation procedure on inhomogeneous dextran it will be possible to produce a more homogeneous preparation which will be superior as a plasma substitute. The risk of getting injurious reactions will be less if the largest and the smallest molecules are removed from the dextran prepared for therapeutical purposes.

Some experiments made in this investigation make it evident that dextran preparations of different degrees of degradation can be divided up into a number of more homogeneous fractions by means of fractional precipitation. Adding ethyl alcohol, under intensive stirring, to water solutions of dextran more and more substance successively will be precipitated. The first precipitate is generally the most high molecular part of the original polymolecular material. The dextran precipitated at higher alcohol concentrations is more low molecular and the last fraction collected will contain the main part of the most low molecular material. The reasons for this separation are firstly the decrease in dissolving power with increasing alcohol concentration and secondly the decrease in solubility of the polymer with increasing molecular weight. The precipitation method applied here is essentially the same as that used on other polymolecular colloids. A complete review of the literature will not be given; reference is made to some recent papers dealing with the fractionation of some other colloids (26-28).

The fractions obtained have been characterized by means of viscosity measurements, molecular weight determinations, and adsorption experiments on active carbon. The relation between intrinsic viscosity and molecular weight of the fractions has been plotted in diagrams. Compared to molecular weight determinations by means of ultracentrifugation and diffusion, viscosity measurements are rather easy to perform. Therefore, such diagrams are of great value both in the manufacture of dextran and in physiological and clinical investigations. From the diagrams an estimation of the molecular weight of a dextran fraction can be made.

Fractionation experiments

Experiment no. 1. A preliminary fractionation was made on 250 ml of a 2 per cent solution of dextran which was partially hydrolyzed in the following way: 100 g raw dextran was dissolved in 2 liters of water with heating. At 80° C 50 ml 4 M HCl was added. The solution was stirred for 10 minutes at 80° C and then neutralized with a 30 per cent solution of sodium hydroxide. After dilution to 2 per cent dextran concentration the solution was filtered. 250 ml of this solution was poured into a bottle which was immersed in a thermostat regulated to a temperature of 20° C. Under intensive stirring ethyl alcohol (96 %) was slowly added from a burette until the solution became turbid. The temperature of the thermostat was raised to 25-30° C and kept at this temperature until the precipitate was dissolved. Then the tempera-

Table 1.

Fractionation experiment no. 1. Principal notation of fractions is K.

Notation of fractions	Alcohol ml	Weight of fractions g
K I	146.1	1.62
K II	17.6	0.27
K III	6.5	0.16
K IV	13.0	0.44
K V	60.0	0.29

Table 2.

Fractionation experiment no. 2. Principal notation of fractions is F I.

Notation of fractions	Alcohol ml	Weight of fractions g
F I, I	1475	Traces
F I, II	90	2.67
F I, III	70	3.59
F I, IV	120	6.40
F I, V	150	4.16

ture was slowly decreased to 20° C and after some time the precipitate thus formed settled to the bottom of the bottle. The supernatant was decanted into another bottle and the precipitate redissolved in water and reprecipitated twice with ethyl alcohol. The supernatant was then treated with more alcohol in the same way. A total of five fractions was obtained. In Table 1 the amount of alcohol added to the solution and the weight of the fractions are given. (The fractions in this series have the principal notation K.)

Experiment no. 2. The following fractionation experiments were performed on a larger scale in a large bottle. The addition of alcohol was made at room temperature until the solution became turbid. Then the bottle was immersed in water kept at 40° C and the precipitate was dissolved. Now the solution was allowed to cool off to 20° C in a thermostat, and the precipitate formed was treated as previously. The original solution contained 40 g partially hydrolyzed dextran in 2 liters of water. The fractionation was interrupted when five fractions had been obtained. The results are given in Table 2. (The fractions in this series have the principal notation F I.)

Experiment no. 3. In this experiment 2 liters of a 2 per cent dextran solution was fractionated as described above. The dextran used was the same as that used in experiment no. 1. It was first separated into the main fractions I and II. Fraction I was divided up into sub-fractions A, B, C, and D. Fraction I A was divided up into sub-fractions a, b, c, and d, I C in a, b, and c and finally I A c in the sub-fractions α and β . The fractions were then designated by new numbers from 1 to 11. The results are given in Table 3. These eleven fractions with the exception of 5 and 6, were again fractionated and a total twenty-five fractions were obtained; cf. Table 4. (The fractions in this series have the principal notation F II.)

Experiment no. 4. From dextran prepared in the same way as in experiment no. 1, but hydrolyzed for 20 minutes, a 2 per cent solution was made. Two liters of this solution gave seven fractions (Table 5). The fraction F III, III has been used to study the enzymatic breakdown of dextran (29). (The fractions in this series have the principal notation F III.)

Experiment no. 5. Finally 200 ml of a 2 per cent solution of a low molecular weight dextran was used for a fractionation. This dextran was isolated from urine of patients

Table 3.

Fractionation experiment no. 3. Principal notation of fractions is F II.

First notation of fractions			New notation of fractions	Weight of fractions g
I	A	a	1	0.34
		b	2	2.9
		c	α	2.8
			β	3.2
		d	5	1.19
	B		6	1.36
	C	a	7	3.4
		b	8	2.8
		c	9	1.8
	D		10	4.3
II			11	4.5

Table 4.

Fractionation experiment no. 3. Refractionations. Principal notation of fractions is F II.

Notation of fractions	Weight of fractions g	Notation of fractions	Weight of fractions g
F II, 1	0.34	F II, 8 a	1.53
F II, 2 a	1.54	F II, 8 b	0.49
F II, 2 b	0.71	F II, 9 a	1.12
F II, 3 a	1.19	F II, 9 b	0.23
F II, 3 b	0.91	F II, 10 a, α ...	1.63
F II, 4 a, α ...	0.70	F II, 10 a, β ...	1.11
F II, 4 a, β ...	1.09	F II, 10 b	0.20
F II, 4 b	0.17	F II, 10 c	0.19
F II, 5	1.19	F II, 11 a	0.64
F II, 6	1.36	F II, 11 b	0.82
F II, 7 a	0.73	F II, 11 c	1.16
F II, 7 b	1.65		

given intravenous infusions of dextran used as a plasma substitute. The isolated dextran was dissolved in water and dialyzed in a cellophane bag against water at 0° C. The solution was evaporated in vacuo to a small volume, and then the dextran precipitated with alcohol in excess. The precipitate was redissolved in water and

Table 5.

Fractionation experiment no. 4. Principal notation of fractions is F III.

Notation of fractions	Alcohol ml	Weight of fractions g
F III, I	1210	6.6
F III, II	50	7.2
F III, III	50	5.0
F III, IV	100	9.6
F III, V	80	3.2
F III, VI	120	2.0
F III, VII	200	2.2

Table 6.

Fractionation experiment no. 5. Principal notation of fractions is U.

Notation of fractions	Alcohol ml	Weight of fractions g
U I	180	0.86
U II	35	1.51
U III	50 —	0.66
U IV	(10)	0.41

this solution purified with adsorbents. Then the solute was again precipitated with alcohol in excess, and the precipitate dried. (For this dextran which was isolated from urine, the specific rotation $[\alpha]_D^{20}$ was measured to $+196^\circ$. The measurement was made with a 1.0 per cent aqueous solution. The value so obtained is very close to the specific rotation for the partially hydrolyzed dextran which is used as a plasma substitute.) The dextran thus obtained has a comparatively low molecular weight because it can pass freely through the glomerular membranes of the kidneys. However, the molecular weight is high enough to prevent the dextran molecules from diffusing through the cellophane bags used in the dialysis. From the molecular weight of the most high molecular fraction of this dextran, an estimation can be made about the largest size of the molecules which are able to pass from the blood through the kidneys into the urine. The results of the fractionation are given in Table 6. The last fraction has been obtained after evaporation of the solution to a small volume. (The fractions in this series have the principal notation U.)

Viscosity measurements

On solutions of the fractions viscosity measurements were made in an Ostwald viscosimeter at 25.0°C . The relative viscosity, η/η_0 , was measured at various concentrations. The solvent was pure water for the fractions obtained in experiment

Table 7.

Viscosity values (η_{sp}/c) for fractions with principal notation K at different concentrations (c) in water.

Fraction	c %	η_{sp}/c
K I	0.50	2.70
	0.40	2.28
	0.30	2.03
	0.20	1.85
	0.00	1.50
K II	0.49	2.37
	0.39	2.10
	0.29	1.97
	0.20	1.75
	0.00	1.30
K III	0.98	1.53
	0.49	1.20
	0.39	1.23
	0.30	1.10
	0.20	1.05
	0.00	0.92
K IV	1.02	0.93
	0.51	0.82
	0.40	0.80
	0.30	0.77
	0.20	0.75
	0.00	0.70
K V	0.98	0.47
	0.49	0.45
	0.39	0.46
	0.30	0.43
	0.20	0.40
	0.00	0.40

Table 8.

Viscosity values (η_{sp}/c) for fractions with principal notation F I at different concentrations (c) in phosphate buffer.

Fraction	c %	η_{sp}/c
F I, II	1.00	0.55
	0.50	0.52
	0.40	0.48
	0.30	0.47
	0.20	0.50
	0.00	0.48
F I, III	0.99	0.42
	0.50	0.40
	0.40	0.38
	0.30	0.40
	0.20	0.40
	0.00	0.38
F I, IV	0.99	0.33
	0.50	0.30
	0.40	0.30
	0.30	0.30
	0.20	0.25
	0.00	0.29
F I, V	0.99	0.26
	0.50	0.24
	0.40	0.25
	0.30	0.27
	0.20	0.25
	0.00	0.25

no. 1; in all other cases a phosphate buffer containing 0.025 M Na_2HPO_4 and 0.025 M NaH_2PO_4 was used. From the relative viscosity, the specific viscosity, $\eta_{sp} = \eta/\eta_0 - 1$, was obtained. The quantity, η_{sp}/c (c in weight per cent) was calculated and plotted in a diagram against c . In these diagrams the intrinsic viscosity, $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$, was determined. In Tables 7-10 the results of all these measurements are given.

It may be mentioned that at the 1st International Rheological Congress hold in Scheveningen, Holland, in September 1948 it was suggested that the following new notation be introduced: $\eta/\eta_0 =$ viscosity ratio; $\eta/\eta_0 - 1 =$ relative increase of viscosity; $(\eta/\eta_0 - 1)/c =$ viscosity factor. However, in this paper the old notations have been used.

Table 9.

Viscosity values (η_{sp}/c) for fractions with principal notation F II at different concentrations (c) in phosphate buffer.

Fraction	η_{sp}/c at $c = 0.50 \%$	η_{sp}/c at $c = 0.40 \%$	η_{sp}/c at $c = 0.30 \%$	η_{sp}/c at $c = 0.20 \%$	η_{sp}/c at $c = 0$
F II, 1.....	2.30	2.05	1.83	1.65	1.24
2 a.....	3.10	2.63	2.30	1.95	1.26
2 b.....	2.16	1.95	1.73	1.55	1.14
3 a.....	2.80	2.45	2.17	1.90	1.36
3 b.....	2.14	1.90	1.73	1.50	1.10
4 a, α	2.52	2.25	1.93	1.75	1.24
4 a, β	2.08	1.83	1.67	1.50	1.12
4 b.....	1.06	1.00	0.97	0.90	0.81
5.....	1.40	1.28	1.23	1.10	0.94
6.....	2.40	2.13	1.90	1.65	1.14
7 a.....	2.04	1.83	1.70	1.50	1.14
7 b.....	1.56	1.63	1.33	1.20	0.96
8 a.....	2.06	1.88	1.70	1.45	1.05
8 b.....	1.34	1.25	1.20	1.05	0.90
9 a.....	1.46	1.35	1.23	1.15	0.94
9 b.....	0.96	0.90	0.87	0.80	0.71
10 a, α	1.24	1.15	1.10	1.00	0.86
10 a, β	0.98	0.95	0.87	0.85	0.74
10 b.....	0.92	0.85	0.83	0.80	0.68
10 c.....	0.76	0.75	0.70	0.65	0.60
11 a.....	0.78	0.75	0.70	0.65	0.57
11 b.....	0.60	0.58	0.53	0.55	0.48
11 c.....	0.54	0.50	0.50	0.45	0.41

Table 10.

Viscosity values (η_{sp}/c) for fractions with principal notation U at different concentrations (c) in phosphate buffer.

Fraction	η_{sp}/c at $c = 0.60 \%$	η_{sp}/c at $c = 0.50 \%$	η_{sp}/c at $c = 0.40 \%$	η_{sp}/c at $c = 0.30 \%$	η_{sp}/c at $c = 0$
U I.....	0.18	0.18	0.18	0.17	0.18
U II.....	—	0.14	0.13	0.13	0.13
U III.....	0.12	0.12	0.10	0.10	0.11
U IV.....	0.08	0.08	0.10	0.10	0.09

From the values of the intrinsic viscosities of fractions with principal notations K, F I, and U, it is evident that a fraction obtained at a lower concentration of alcohol has a higher intrinsic viscosity compared to a fraction precipitated at a higher concentration of the non-solvent. In the case (F II) where refractionations have been made, the last sub-fraction in one main fraction has, as would be expected, a lower intrinsic viscosity than the first subfraction in the immediately following main fraction. Due to a certain degree of polymolecularity the main fractions are over-

Table 11.

Sedimentation and diffusion constants of fractions with principal notation F II at different concentrations (c). The sedimentation constants, s , are given in S -units. The diffusion constants, D , are given in units of 10^{-7} cm²/sec. The values refer to a temperature of 20.0° C and pure water as solvent.

Fraction	c %	s	D_A	D_m	$(dB/dx)_0$
F II, 1	0.50	19.5			
F II, 2 a	0.60	19.6			
	0.50	32.3	0.23	0.29	
	0.35		0.26	0.32	
	0.30	51.6			
	0.15	89.9			
	0.00	150	0.25		0.7
F II, 3 a	0.50	24.3			
F II, 5	0.50	12.9			
F II, 10 a, α	0.90		0.81	0.86	
	0.60		0.76	0.81	
	0.48	12.7			
	0.30	16.5	0.64	0.72	
	0.20	18.8			
	0.10	22.4			
	0.00	26.4	0.55		0.7
F II, 10 a, β	0.60		0.98	0.99	
	0.60		0.99	1.09	
	0.50	11.0			
	0.40		0.89	0.95	
	0.25	15.3			
	0.20	18.3			
	0.10	19.4			
	0.00	23.3	0.75		0.5
F II, 11 c	0.50	6.1			
	0.25	7.4			

lapping. Compare in Table 9 F II, 8 b and F II, 9 a or F II, 9 b and F II, 10 a α and F II, 10 a β .

As to the concentration dependence of η_{sp}/c this is especially pronounced for the first fraction obtained in a fractionation experiment. This is most clearly illustrated by the first fraction in experiment no. 1 (K). The same phenomenon has also been observed for fractions of other high molecular substances, e. g. certain plastics.

Measurements in the ultracentrifuge

The sedimentation constants for some of the fractions were determined in the ultracentrifuge according to SVEDBERG. The rotor was for the most part run at a

Table 12.

Sedimentation and diffusion constants of fractions with principal notation F I at different concentrations (c). The sedimentation constants, s , are given in S -units. The diffusion constants, D , are given in units of 10^{-7} cm²/sec. The values refer to a temperature of 20.0° C and pure water as solvent.

Fraction	c %	s	D_A	D_m	$(dB/dx)_0$
F I, II	0.50	5.8			
	0.25	6.7			
F I, III	0.70		2.29	2.69	
	0.50	4.78	2.09	2.41	
	0.30	5.41			
	0.25		1.93	1.91	
	0.20	5.87			
	0.15	5.95			
	0.00	6.55	1.73		0.9
F I, IV	0.70	3.93			
	0.60		2.70	2.95	
	0.60		2.61	2.45	
	0.60		2.74	2.84	
	0.50	4.41			
	0.47	4.61			
	0.35	4.39			
	0.30		2.61	2.55	
	0.30		2.50	2.37	
	0.25	4.69			
	0.17	5.09			
	0.00	5.30	2.40		0.7
F I, V	0.70	3.40	3.30	3.27	
	0.70		3.45	3.87	
	0.70		3.48	3.46	
	0.50	3.65			
	0.35	3.74	3.30	3.64	
	0.35		3.25	3.49	
	0.25	3.87			
	0.21	3.95			
	0.14	3.92			
	0.00	4.10	3.12		0.7

speed of 60 000 r. p. m. In some runs of the most high molecular fractions a speed of 25 000 r. p. m. was used. The sedimentation was followed by means of Lamm's scale method (30). As to the details of the ultracentrifugal technique reference is made to the monograph of SVEDBERG and PEDERSEN (31).

The sedimentation constants of dextran fractions are concentration dependent. Hence for each fraction determinations had to be made at various concentrations. Extrapolation was then made to infinite dilution. The measurements were made in a phosphate buffer containing 0.025 M Na₂HPO₄ and 0.025 M NaH₂PO₄. The values obtained (Table 11-13) for the sedimentation constant, s , are given in S -units and refer to a temperature of 20.0° C and pure water as a solvent. As is seen from

Table 13.

Sedimentation and diffusion constants of fractions with principal notation U at different concentrations (c). The sedimentation constants, s , are given in S -units. The diffusion constants, D , are given in units of 10^{-7} cm²/sec. The values refer to a temperature of 20.0° C and pure water as solvent.

Fraction	c %	s	D_A	D_m	$(dB/dx)_0$
U I	0.80	2.64	4.62	4.81	
	0.50	2.66	4.69	5.13	
	0.50		4.76	4.91	
	0.15	2.62			
	0.00	2.64	4.69		0.8
U IV	0.60		7.46	7.53	
	0.50	1.60			
	0.30		7.55	7.82	
	0.25	1.62			
	0.00	1.64	7.50		0.6

the tables, the concentration dependence is most pronounced for the most high molecular fractions.

In order to get an opinion about the homogeneity of the fractions the dB/dx -values according to GRALÉN (32) have been calculated. These indicate how the width, B , of the concentration gradient curve, $(dc/dx, x)$, changes with the distance, x , from the center of rotation. B is calculated as the quotient between the area and the maximum height of the curve. The values, $(dB/dx)_0$, extrapolated to zero concentration are given in Tables 11–13. All the values are corrected for the influence of diffusion. The rather high values are probably due to less selective fractionation conditions; cf. KINELL and RÅNBY (28).

Diffusion measurements

On some of the fractions the diffusion constant was determined. Experiments were made at different concentrations in a diffusion cell according to CLAEßSON (33). LAMM's scale method was used. The solvent was the same phosphate buffer as that used in the sedimentation measurements. The temperature was 20.0° C. The diffusion constants, given in units of 10^{-7} cm²/sec. and referred to pure water as a solvent are given in Tables 11–13. The D_A - and D_m -values are the diffusion constants calculated according to the area and the moment method respectively (cf. LAMM (30)). For a homogeneous substance both values are equal. A polymolecular substance has always the D_m -value larger than the D_A -value (32). In these experiments the D_m -values are less accurate than the D_A -values and for this reason the D_A -values have been used in the calculations of the molecular weights. As is evident from the tables the diffusion constants are concentration dependent. This dependence is the more pronounced the higher the molecular weight. In the Tables 11–13 the D_A -values extrapolated to zero concentration are also given.

Table 14.

Molecular constants of some dextran fractions.

Fraction	Molecular weight	f/f_0	Length/thickness	Total length in A	Total thickness in A
U IV.....	14,000	1.88	17	200	12
U I.....	36,000	2.19	25	360	14
F I, V.....	84,000	2.49	34	580	17
F I, IV.....	141,000	2.72	42	790	19
F I, III.....	240,000	3.15	58	1,170	20
F II, 10 a, β	1,990,000	3.61	78	2,870	37
F II, 10 a, α	3,050,000	4.25	110	4,180	38
F II, 2 a.....	38,000,000	4.03	98	9,000	92

Molecular weights of the fractions

Using Svedberg's well known formula (31) ($M = RTs/(1 - V_0)D$) to molecular weight calculations one must know, besides the sedimentation and diffusion constants, the partial specific volume, V , of the solute. For fraction F I, IV the value of V was determined to be 0.62. (We are very indebted to Professor CARL DRUCKER for having performed this determination. It was made in a phosphate buffer (see above) at a concentration of 1.0 per cent dextran.) There is no reason to believe that the value should not be the same for all the fractions.

The sedimentation and diffusion constants extrapolated to zero concentration were used in the calculations. The values obtained are given in Table 14. The fractions obtained in the experiments described above are not, as can be judged from the dB/dx -values, quite homogeneous. Hence the proper values for their molecular weights should be some well defined averages. As has been shown for instance by JULLANDER (34), Svedberg's formula does not generally give any well defined averages. Thus it matters very little which of the values, D_A or D_m , of the diffusion constant are used. It can be mentioned that D_m is a weight average value for the diffusion constants and if the same average value could be found for the sedimentation constants, the use of these two values in Svedberg's formula would give a molecular weight which approaches the true weight average value of the molecular weights. (Cf. JULLANDER (34) and even SINGER (35).)

The frictional ratio, f/f_0 (cf. SVEDBERG and PEDERSEN (31)), has been calculated for the fractions. As is seen from Table 14 this ratio is considerably in excess of 1.0. If f/f_0 is larger than 1.0 the molecules either deviate from the compact spherical shape, are hydrated or they are asymmetrical as well as hydrated. Making the very simplified assumption that the dextran molecules are prolate unhydrated ellipsoids of rotation values of the length and thickness of the molecules can be calculated (31). These quantities, then, correspond to the axes of the ellipsoid. The values obtained are given in Table 14. However, it must be assumed that the dextran molecules are hydrated to some extent and that they will therefore be less prolate than indicated by the values in the table.

In Fig. 1 the intrinsic viscosity, $[\eta]$, of the dextran fractions has been plotted versus the molecular weight, M , and the length, l , of the molecules. (The values for

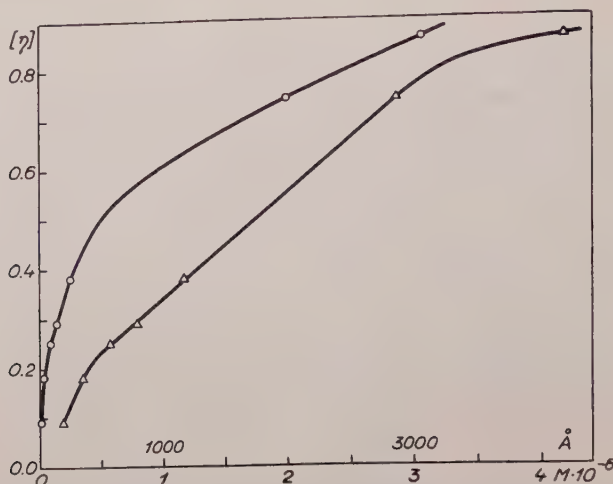


Fig. 1. The relation between intrinsic viscosity $[\eta]$ and molecular weight M (—○—○—○—) and the relation between intrinsic viscosity and calculated molecular length l in Å units (—△—△—△—).

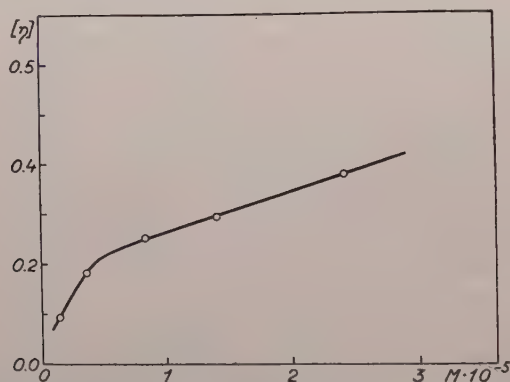


Fig. 2. The relation between intrinsic viscosity $[\eta]$ and molecular weight M of dextran fractions of comparatively low molecular weight.

the very high molecular fraction, F II, 2 a, are not included.) In Fig. 2 $[\eta]$ versus M has been plotted for the dextran fractions which belong to a molecular weight interval which is of special importance in the production of partially hydrolyzed dextran used as a plasma substitute. As is evident from the curve an almost linear relation between $[\eta]$ and M is found in the interval $40\,000 < M < 300\,000$. This relation can be expressed in the following formula:

$$[\eta] = 8.2 \cdot 10^{-7} \cdot M + 0.18$$

(i. e. a modified Staudinger equation).

For $M < 40\,000$ the molecular weight decreases less with decreasing intrinsic viscosity than the formula predicts. In Fig. 3 M is studied as a function of the length l for the

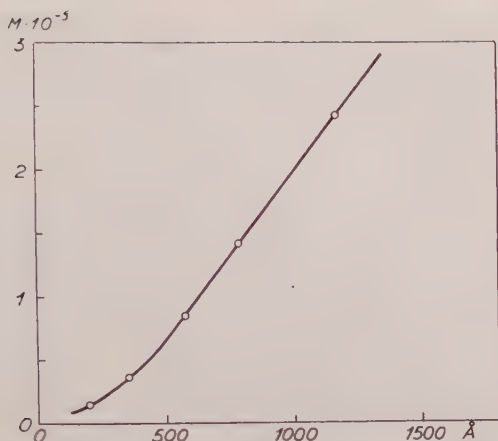


Fig. 3. The relation between molecular weight M and calculated molecular length l (in Å units) of dextran fractions of comparatively low molecular weight.

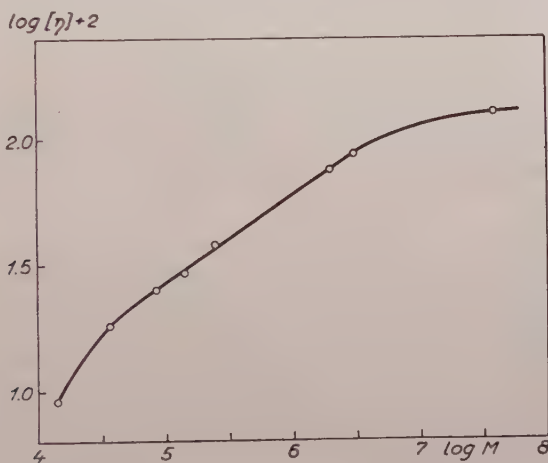


Fig. 4. The relation between $\log [\eta]$ and $\log M$.

same low molecular fractions. In the interval $50\,000 < M < 300\,000$ M is a linear function of l . Finally in Fig. 4 $\log [\eta]$ is plotted as a function of $\log M$. This plot includes all fractions in Table 14. In a large molecular weight interval a linear relation between $\log [\eta]$ and $\log M$ is approximately valid. From this straight line section an inclination of 0.34 is calculated. This is a rather low value and an interpretation cannot be given here.

The values obtained on the molecules in fraction U I supply information about the approximate size of the dextran molecules which are able to pass freely from the blood through the glomerular membranes in the kidneys into the urine. The molecular weight obtained for U I is 36 000. With respect to the production of plasma substitute it is of particularly great interest to know the thickness of the molecules in the most high molecular fraction which passes through the kidney membranes. In

Table 14 the value of the thickness of the molecules of fraction U I is given as $14 \text{ \AA}$. However, it must be emphasized that probably the "effective" thickness of the molecules is larger. In the calculation it was assumed that the molecules were unhydrated. This is a simplification which is very likely too rough. Furthermore, ramification of the dextran molecule makes the "effective" thickness greater than the calculated average value.

The values given in the tables show that the most high molecular fractions of the slightly hydrolyzed dextran have very high molecular weights. Thus fraction F II, 2 a has a molecular weight of $38 \cdot 10^6$. This value is not very reliable but it nevertheless shows that fraction F II, 2 a contains immense particles of a size which is of the same order of magnitude as that of many virus species. As will be shown below such particles can easily be visualized in the electron microscope. Finally it can be mentioned that solutions of F II, 2 a are rather stable. Under the dissolution, warming up to a rather high temperature is possible without any indication of a breakdown. Therefore, it seems probable that these enormous particles are not aggregates but real molecules. In the formation of dextran by *Leuconostoc mesenteroides* it is assumed that the bacteria produce an enzyme which in the surrounding sugar solution changes saccharose into dextran. Thus in this process very favourable conditions for the formation of gigantic polysaccharide molecules are realized.

Adsorption experiments

The adsorption on active carbon was investigated for some fractions, namely F I, II—V and F IV, I c, F IV, II and D I. At the same time the adsorption of glucose was studied.

The last three preparations have not been previously described in this paper. F IV, I c and F IV, II are the last fractions of a new fractionation experiment which was carried out in order to obtain a suitable substance for these adsorption measurements. As usual the starting material was partially hydrolyzed dextran. The intrinsic viscosity of F IV, I c and F IV, II was determined to 0.18 and 0.13 respectively. The fraction D I has a very low molecular weight. It was obtained in the following way. Partially hydrolyzed dextran (plasma substitute) was further hydrolyzed with sulphuric acid, the acid removed by means of barium hydroxide, the solution filtered and finally dialyzed in a cellophane bag against distilled water. The solution outside the cellophane bag was evaporated to dryness. In this way a low molecular dextran consisting of the molecules which had diffused through the cellophane bag could be obtained. This substance was dissolved in a small amount of water and the solution was fractionated in the usual way by means of ethyl alcohol. The fraction first obtained had an intrinsic viscosity of 0.05 which corresponds to a molecular weight of about 6 000–8 000 (cf. Fig. 2).

As adsorbent an active carbon, Carboraffin Supra, was used. The quantities of soluble substances which could be extracted from this carbon were so small that they did not disturb the measurements.

The adsorption experiments were made in the following way: an appropriate amount of dextran was dissolved in distilled water; the concentration was determined by measuring the dry weight at 105°C . A certain amount of dextran solution (5 ml) was weighed into a bottle closed by a ground-glass stopper. An appropriate amount of active carbon (0.2 g) was added. The bottle was then placed in a thermostat at 25.0°C . Now and then it was shaken. After forty-eight hours the carbon was removed

Amount adsorbed
in g per g carbon.

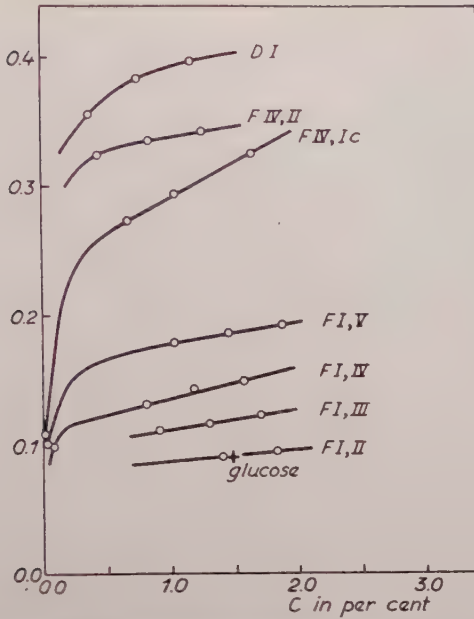


Fig. 5. Amount adsorbed in g per g active carbon as a function of the concentration after adsorption in weight per cent.

Amount adsorbed
in g per g carbon
at 1.5 per cent.

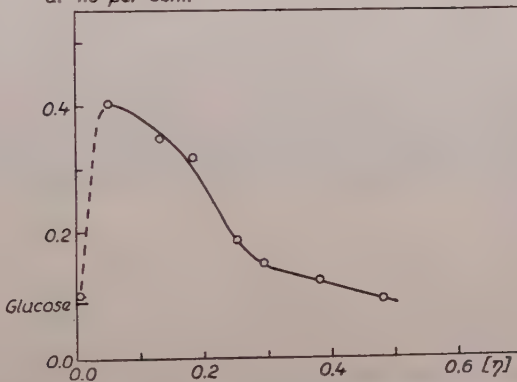


Fig. 6. Amount adsorbed (g per g active carbon) at the dextran concentration 1.5 per cent as a function of the intrinsic viscosity.

from the solution (filtering through a glass filter, Jena G 4, under pressure) and the concentration of the solution determined. The amount of dextran adsorbed per gram of carbon was calculated. The method described here is essentially the same as that used earlier by e. g. I. CLAESSON and S. CLAESSON (36) in their adsorption measure-

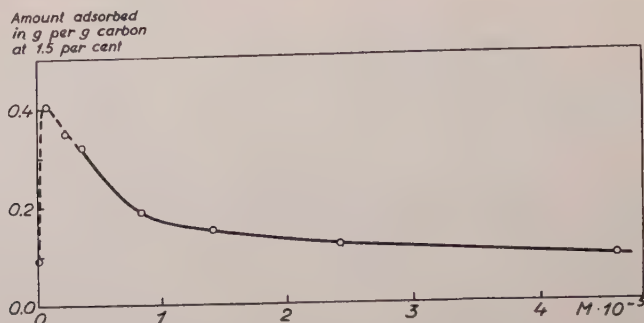


Fig. 7. Amount adsorbed (g per g active carbon) at the dextran concentration 1.5 per cent as a function of the molecular weight.

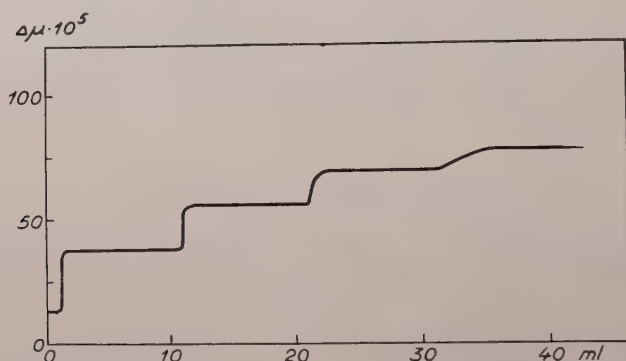


Fig. 8. Frontal analysis diagram of a solution of mono-, di-, tri-, and tetrasaccharides from dextran. (Difference in refractive index as a function of the volume which has been pressed through the carbon filter.)

ments on some polyvinyl acetates. In Fig. 5 the adsorbed amount of dextran in gram per gram carbon has been plotted against the final concentration in weight per cent of the solution (adsorption isotherms). As is seen the isotherm of fraction F IV, I c is somewhat different from all the other isotherms. The adsorption at the arbitrarily chosen concentration 1.5 per cent has been plotted against the intrinsic viscosity (Fig. 6) and against the molecular weight (Fig. 7) of the fractions. (The molecular weights not directly measured have been taken from the relation between $[\eta]$ and M in Fig. 2.) Evidently the adsorption increases with decreasing molecular weight. This result is in agreement with the measurements of I. and S. CLAESSON on polyvinyl acetates and cellulose nitrates (34, 36). Later (unpublished) investigations by S. CLAESSON have shown the validity of the same law even for other high polymeric substances. However, in the series glucose, disaccharide, trisaccharide etc. the adsorption increases with increasing molecular weight (cf. e. g. adsorption measurements by TISELIUS and HAHN (37)). Therefore the adsorption passes through a maximum when the molecular weight increases successively from that of glucose, disaccharide, trisaccharide etc. to that of more and more high molecular dextrans. An accurate determination of this adsorption maximum is difficult. For the active

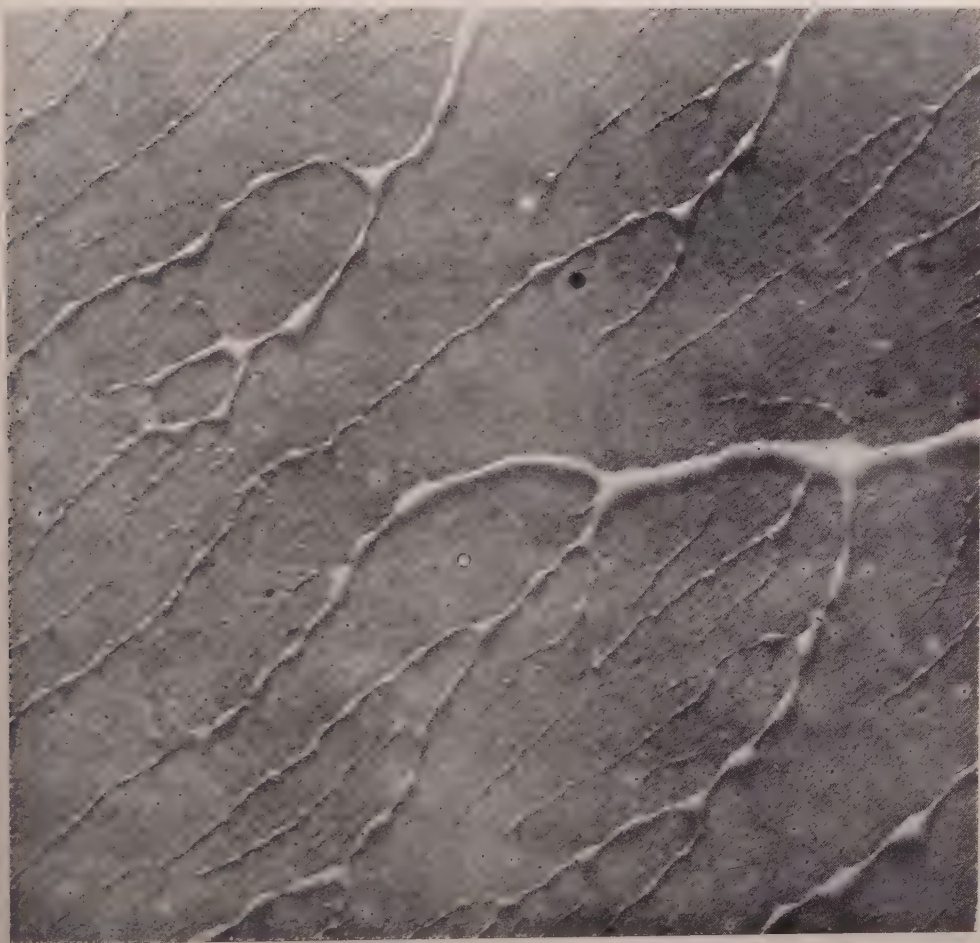


Fig. 9. Electron micrograph of dextran. Magnification = 23 000 times.



Fig. 10. Electron micrograph of the dextran fraction F II, 2 a. Magnification = 23 000 times.

carbon used in this investigation the maximum is situated in a molecular weight interval where measurements are rather laborious to perform. In certain investigations in progress on the isolation of di- and trisaccharides from partially hydrolyzed dextran, it has been shown that the adsorption increases with increasing molecular weight. By means of displacement analysis on active carbon it is possible to isolate and separate glucose, disaccharides and trisaccharides from dextran hydrolyzates. In order to elucidate the increase in adsorption for the series glucose, disaccharide, trisaccharide etc. a diagram from frontal analysis of a very much broken down dextran is shown in Fig. 8. (As to the technique used reference is made to publications of TISELIUS and CLAESSEON (38, 39). The first step in Fig. 8 corresponds to glucose which is less adsorbed. The mixture also contained di-, tri- and tetrasaccharides. Here the adsorption increases with increasing molecular weight. Thus in the second step in Fig. 8 the disaccharide has also passed through the adsorption filter etc.

Investigations in the electron microscope

High molecular, unhydrolyzed and unfractionated dextran has been studied in the electron microscope by INGELMAN and SIEGBAHN (40, 41). The pictures obtained of the dextran molecules showed long, branched threads. Now electron microscope pictures have been taken of slightly hydrolyzed and fractionated dextrans. The gold shadow casting method of WILLIAMS and WYCKOFF (42, 43) has been used. The pictures obtained are similar to the earlier ones. Notwithstanding slight hydrolysis, the most high molecular dextran molecules are still visible.

The technique used in taking the pictures has been the usual one. Very dilute solutions of dextran in distilled water were evaporated on extremely thin films of cellulose nitrate. Then gold was evaporated against the films at an appropriate angle. The electron optical magnification was 7 500 times. The pictures were then photographically enlarged to an over all magnification of 23 000 times. In Fig. 9 a picture of unhydrolyzed, unfractionated dextran is shown. Fig. 10 is a picture of fraction F II, 2 a. (Unfortunately it is difficult to obtain good reproductions of the original electron microscope photographs.) So far it has not yet been possible to estimate the lowest molecular weight of the fractions which are still visible in the electron microscope. Fractions with a lower molecular weight than that of F II, 2 a can still be visualized. Therefore a possibility seems to exist for the study of the first phase of the breakdown of the extremely high molecular dextran by means of the electron microscope.

SUMMARY

Using ethyl alcohol as a precipitant dextran fractions, rather homogeneous with respect to molecular weights, have been obtained from solutions of dextran of varying degrees of degradation. These fractions have been investigated by means of viscosity measurements, ultracentrifugation, diffusion and adsorption experiments. From the sedimentation and diffusion data obtained, the molecular weights of representative fractions have been calculated. Some of the most high molecular fractions have been studied in the electron microscope.

The authors wish to thank Professor T. SVEDBERG and Professor A. TISELIUS for the privilege of carrying out this work in their laboratories. We also wish to thank Fil. lic. P.-O. KINELL for his interest in these investigations and for valuable discussions. A great part of the numerical calculations have been carried out by Mr. E. HELLMAN and his staff. We also wish to thank those technicians of the institutes who in several ways have given valuable help in the performance of these investigations. The work has been financially supported by A.B. Pharmacia, Stockholm, and Svenska Sockerfabriks A.B., Arlöv.

- REFERENCES. 1. Grönwall, A. and Ingelman, B. Nord. Med. 21 (1944) 247. — 2. ——— Acta Physiol. Scand. 7 (1944) 97. — 3. ——— Acta Physiol. Scand. 9 (1945) 1. — 4. ——— Nature 155 (1945) 45. — 5. Ingelman, B. Socker 1 (1945) 179. — 6. Bohmansson, G., Rosenqvist, H., Thorsén, G. and Wilander, O. Acta Chir. Scand. 94 (1946) 149. — 7. Rosenqvist, H. Acta Chir. Scand. 95 (1947) suppl. 124. — 8. Ingelman, B. Acta Chem. Scand. 1 (1947) 731. — 9. Hint, H. C. and Thorsén, G. Acta Chem. Scand. 1 (1947) 808. — 10. Grönwall, A. Farm. Revy 46 (1947) 688. — 11. Bohmansson, G. Report at the Scandinavian Surgical Congress in June 1947. — 12. Thorsén, G. Report at the Scandinavian Surgical Congress in June 1947. — 13. Kock, W. Report at the Scandinavian Surgical Congress in June 1947. — 14. Goldenberg, M. Crane, D. and Popper, H. Am. J. Path. (1947) 939. — 15. Rosenqvist, H. Nord. Med. 40 (1948) 2376. — 16. Thorsén, G. Nord. Med. 40 (1948) 2374. — 17. Bang Rasmussen, K. Nord. Med. 40 (1948) 2381. — 18. Lundy, J. et al. Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic 23 (1948) 444. — 19. Bohmansson, G., Thorsén, G. and Wilander, O. J. Internat. Chirurgie 8 (1948) 890. — 20. ——— Unpublished. — 21. Rosenqvist, H. Unpublished investigations. — 22. Grönwall, A. Unpublished investigations. — 23. Ingelman, B. Unpublished investigations. — 24. Claesson, S. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. In press. — 25. Hint, H. C. and Thorsén, G. Unpublished investigations. — 26. Cragg, L. H. and Hammerschlag, H. Chem. Revs. 39 (1946) 79. — 27. Kinell, P. O. Acta Chem. Scand. 1 (1947) 832. — 28. Kinell, P. O. and Rånby, B. G. Advances in Colloid Science. Vol. III. In press. — 29. Ingelman, B. Acta Chem. Scand. 2 (1948) 803. — 30. Lamm, O. Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsaliensis. IV 10, N:o 6 (1937). — 31. Svedberg, T. and Pedersen, K. O. The Ultracentrifuge. Oxford (1940). — 32. Gralén, N. Sedimentation and Diffusion Measurements on Cellulose and Cellulose Derivatives. Uppsala (1944). — 33. Claesson, S. Nature 158 (1946) 834. — 34. Jullander, I. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 21 A, N:o 8 (1945). — 35. Singer, S. J. Pol. Science 1 (1946) 445. — 36. Claesson, I. and Claesson, S. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 19 A, N:o 5 (1944). — 37. Tiselius, A. and Hahn, L. Kolloid Zeitschr. 105 (1943) 177. — 38. Tiselius, A. and Claesson, S. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 15 B, N:o 18 (1942). — 39. Claesson, S. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 23 A, N:o 1 (1946). — 40. Ingelman, B. and Siegbahn, K. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 18 B, N:o 1 (1944). — 41. ——— Nature 154 (1944) 237. — 42. Williams, R. C. and Wyckoff, R. W. G. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 58 (1945) 265. — 43. ——— J. Applied Phys. 17 (1946) 23.

Institutes of Biochemistry and Physical Chemistry, University of Uppsala.

Tryckt den 8 mars 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Molecular Weight Determinations by the Isopiestic Method

By STIG CLAEISSON

With 2 figures in the text

A frequently occurring problem in many chemical investigations is the determination of molecular weights. Well known standard methods are worked out in the cases of both low and high molecular substances. Freezing point lowering, boiling point elevation and vapour and gas density measurements are widely used for low molecular substances; ultracentrifugation, diffusion, light scattering and osmotic pressure measurements for high molecular substances.

For substances with molecular weights in the intermediate range (1 000—10 000) determinations are more difficult to make. The effects caused by such substances on the freezing and boiling points of the solvents are rather too small to measure with sufficient accuracy, and the methods for high molecular substances are also unsuitable. Many attempts have of course been made to measure molecular weight in this intermediate region. Except for various ingenious devices for increasing the accuracy of measurement of freezing point depression and boiling point elevation, the most popular way has been to study the lowering of the vapour pressure of the solutions directly.

The decrease in vapour pressure can be observed directly on a manometer placed between the solvent and the solution, and apparatuses for this purpose have been described by several workers e.g. by CHANDLER (1). It is then very convenient to use the solution itself as manometer fluid.

This experimental procedure unfortunately presents certain difficulties as very careful outgassing is necessary, and the measurement of the pressure difference is very delicate. An advantage is, however, that an *absolute* determination of the vapour pressure lowering is obtained.

Among other methods may be mentioned the dynamic method which is capable of very high accuracy. Here the amount of vapour in a given volume of air in equilibrium with the solution is determined. Rather large amounts of substance are however needed, and furthermore the method is not particularly suited for routine work. Detailed information can be found in the paper by PEARCE and SNOW (2).

Measurements of dew points have also been used for the same purpose. See e.g. HEPBURN (3).

The method which no doubt seems to be best suited for molecular weight determinations in the intermediate region is, however, isopiestic distillation, which in principle is very simple. Two beakers, one containing a solution of a weighed amount of a substance with known molecular weight and another containing a solution

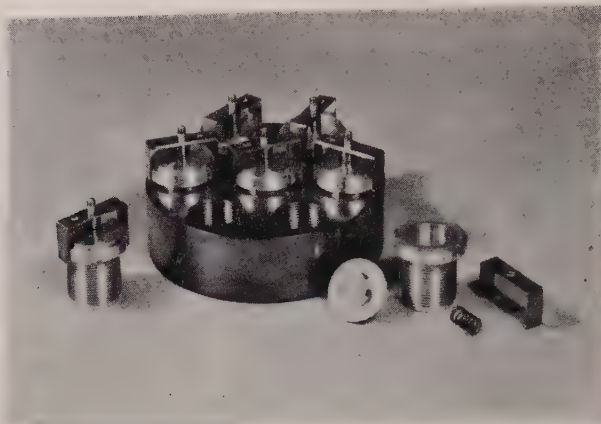


Fig. 1. The copper block with the silver beakers.

of a weighed amount of the unknown substance are placed in a closed evacuated container. Solvent will then distil from the more dilute solution to the more concentrated one, until equilibrium is reached when the activity of the solvent is the same in both beakers. If the activity coefficient is the same for both substances, their molecular weights will be proportional to their concentrations. Measurements of this kind, performed with very simple equipment, have been described among others by SIGNER (4) and AF HÄLLSTRÖM (5). A disadvantage of this method is that measurements can only be carried out relative to a known substance. A rather long time is also required to reach equilibrium if a simple glass apparatus is used. It took SIGNER more than one month and AF HÄLLSTRÖM about four days. An advantage is on the other hand that measurements can be made at any suitable temperature.

The use of the isopiestic method for accurate determinations of activities was pointed out by BOUSFIELD, and it has since then been used in a great number of investigations (6). Extensive and very accurate results have been published by SINCLAIR (7) and by ROBINSON (8). Excellent descriptions of the experimental technique for water solutions are given by SCATCHARD, HAMER and WOOD (9) and by MASON (10).

The isopiestic method especially has found very great use for the determination of the activity of electrolytes even in very dilute solutions and the accuracy obtained in these measurements is very high. It then seems strange to the present author that this highly developed technique has not found more wide-spread use also for molecular weight determinations, as the better designed apparatuses are quite as convenient to use as the more »simple» ones and at the same time will give higher accuracy and require shorter time for equilibrium to be established.

In this paper an apparatus will be described which for some time has been used by the present author for such molecular weight determinations. The apparatus very closely resembles the one described by SCATCHARD (9), but an essentially new feature is an arrangement for closing the beakers with covers before the vacuum is broken. This is absolutely necessary when volatile liquids are used as solvents.

As has been pointed out by SCATCHARD in his excellent discussion of the isopiestic

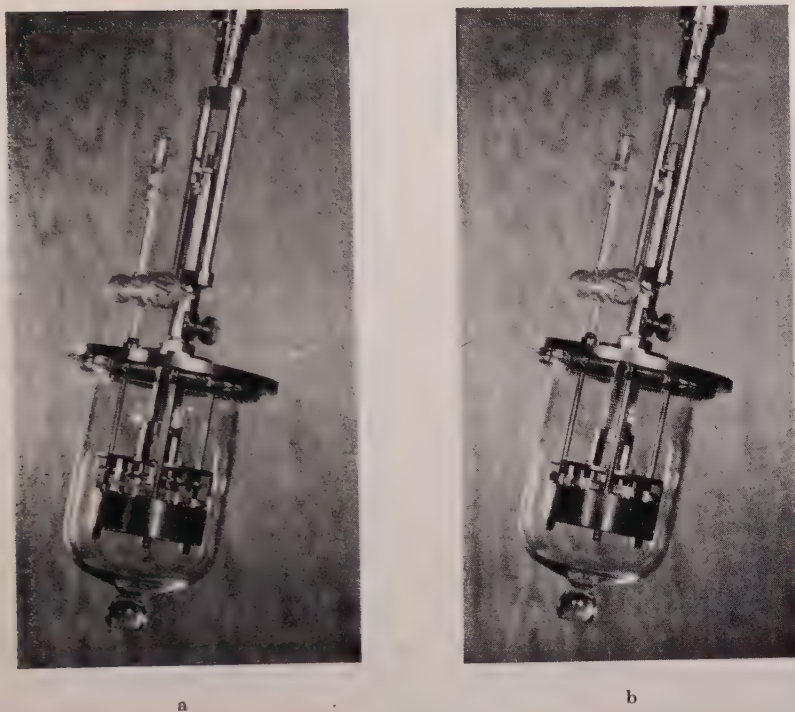


Fig. 2. The assembled apparatus with beakers a) open and b) closed.

method, it is most important to have a very good thermal contact between the beakers and to have the solutions completely free from air during the equilibration. These requirements are fulfilled in the instrument constructed by the present author.

Fig. 1 and 2 show the apparatus. The beakers for the solution are made of pure silver and have an inside diameter of 17 mm and a height of 28 mm. Their weight is about 55 grams. Seven beakers are screwed into a block of pure copper (diameter 100 mm, height 30 mm and weight 1 600 g) which is heavy enough to neutralize the effects of small fluctuations in temperature. The fit of the screw-threads is good and the plane bottoms of the beakers are in contact with the copper block. In this way good thermal conductivity is ensured between the beakers.

During an experiment the copper block is hanging on three brass rods from a brass plate (10 mm thick), and a bell jar serves as the outer container (Fig. 2). A second plate (2 mm thick) serves as holder for the covers of the beakers. It slides on the three brass rods and is fastened to a flexible metal tubing and can consequently be lowered from the outside without breaking the vacuum. The shafts from the covers pass through holes (2.5 mm) in the plate and are kept in position by small nuts on top of the plate and are pressed downward by the spiral spring between the cover and the clip on the lower side of the plate.

When an experiment is finished the whole plate with the covers is lowered until the clips pass over the rims of the beakers. The vacuum is then broken, the bell jar removed and the nuts on the shafts of the covers unscrewed. The whole block can

then be detached from the rods, and the beakers — closed by covers, springs and clips — removed for weighing.

The covers are ground to fit the plane rim of the beakers but are not vacuum tight. The loss of weight due to evaporation is however small, and even when such volatile solvents as pentane are used, it does not amount to more than a few tenths of a milligram per hour.

The gasket between the bell jar and the top plate is of neoprene and placed in a groove. The bell jar is pressed in position against the gasket with the vacuum pump working when the apparatus is assembled. No inconveniences have been observed with this kind of gasket even when such solvents as benzene are used but it is advisable to replace the gasket more often in such cases. The stopcock is greased with wool fat extracted with ethanol and acetone, this grease is quite dependable for all kinds of solvents during the relatively short time of an experiment.

An experiment is now carried out as follows. Weighed amounts (10—25 mg) of the substances are introduced into the beakers. The solvent (about 2 ml in each beaker) is then added and the apparatus assembled. To avoid splashing the apparatus is only evacuated to a pressure about twice the vapour pressure of the solvent. The remaining air is then slowly let out into a previously evacuated flask (about 3 litres). This procedure is repeated until constant pressure is reached and then five more times. During the final part of the evacuation the apparatus is placed in the thermostat ($25 \pm 0.005^\circ \text{C}$) and after the evacuation rotated slowly in an inclined position (20 revolutions per min.) until equilibrium is reached which usually takes about 12 hours. The beakers are then closed and weighed as described above.

The apparatus is easy to handle and duplicate determinations of two unknown substances can be made over night, three of the seven beakers are then filled with reference substances.

The limit of accuracy for this apparatus is of course the same as for earlier described apparatus of similar type and it has been confirmed that the reproducibility is better than 0.1 % if due care is taken. However, for molecular weight determinations such a high accuracy is not needed as the deviations from Raoult's law are mostly larger. It is therefore quite sufficient to carry out routine weighings on an ordinary analytical balance, which simplifies the procedure and yet keeps the reproducibility better than 1 %.

The influence of the deviations from Raoult's law can, of course, be minimized by using reference substances of the same type and molecular size as the unknown ones. At least the deviations due to the difference in size of the molecules tend to cancel in this way (11).

The apparatus was constructed especially for use in connection with work on breakdown products of proteins and high polymers. The results from such experiments will be reported in due course, the experimental data in Table 1 are only meant to give an idea of the accuracy easily accessible in routine work carried out without any special care.

In conclusion may be stated that the apparatus and experimental arrangements described above offer a very simple and convenient way for determining molecular weights.

Substances used: glucose, C. P., Merck & Co., U. S. A.; saccharose, K 2, Svenska Sockerfabriks A. B. Sweden; naphthalene, 9614 cal/g, Merck, Germany; phenanthrene, gereinigt, Schering-Kahlbaum, Germany; trimyristin and tristearin, reinst, Heyl & Co., Germany; benzene, special thiophene free, Coleman & Bell Co., U. S. A.

Table 1.

Substance		Solvent	Equilibrium conc (%)		Molecular weight	
»Unknown»	Reference		»Unknown»	Reference	found value	true value
glucose	saccharose	water	0.906	1.729	179.4	180.2
naphtalene	phenanthrene	benzene	1.976	2.722	129.4	128.2
tristearin	trimyristin	benzene	1.901	1.526	900.9	891.5

The author wants to express his sincere gratitude to Prof. ARNE TISELIUS and to Prof. THE SVEDBERG for their kind interest in this work.

SUMMARY

An apparatus is described for isopiestic measurements with volatile organic solvents.

Institutes of Physical Chemistry and Biochemistry, University of Uppsala.

REFERENCES. (1) **Chandler, R. C.**, J. Phys. Chem. *44*, 574 (1940). — (2) **Pearce, J. N.** and **Snow, R. D.**, J. Phys. Chem. *31*, 231 (1927). — (3) **Hepburn, J. R. I.**, J. Chem. Soc. 1932, 550. — (4) **Signer, R.**, Ann. *478*, 246 (1930). — (5) **af Hällström, M.**, Ann. Acad. Sci. Fennicae *A 34*, No 5 (1932). — (6) **Bousfield, W. R.** and **Bousfield, C. E.**, Proc. Roy. Soc. London *A 103*, 429 (1923). — (7) **Sinclair, D. A.**, J. Phys. Chem. *37*, 495 (1933). — (8) **Robinson, R. A.** and **Harned, H. S.**, Chem. Rev. *28*, 419 (1941). — (9) **Scatchard, G.**, **Hamer, W. J.** and **Wood, S. E.**, J. Am. Chem. Soc. *60*, 3061 (1938). — (10) **Mason, C. M.**, J. Am. Chem. Soc. *60*, 1638 (1938). — (11) **Tompa, H.**, J. Chem. Phys. *16*, 292 (1948).

Tryckt den 2 april 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Zur Biochemie der Tumorentwicklung und der Tumورهemmung¹

Von HANS VON EULER und GRETA LINDEMAN

Die grosse Zahl der Substanzen, welche auf Grund mehr oder weniger zureichenden Versuchsmaterialies als „tumورهemmend“ bezeichnet wurden, geht aus der in der Monographie „Biochemie der Tumoren“² gegebenen Zusammenstellung hervor, in welcher (1941) die folgenden Gruppen unterschieden wurden:

Aldehyde und Ketone (STRONG 1938), Aminonaphtalinsulfosäuren, Diamine und Sulfamide (BOYLAND u. a.), chlorhaltige Stoffe, besonders Kampfgase (BERENBLUM, KENDALL; CRABTREE), Mitosengifte (DUSTIN (1934), BOYLAND, DITTMAR, McILWAIN; LETTRÉ), kanzerogene Substanzen (HADDOW (1935); ROBINSON (1938); WHITE u. WHITE (1938)).

Dazu kommen die östrogenen Stoffe (v. MOELLENDORFF), von welchen besonders Östradiole als Mitosengifte fungieren (CLARKE u. VIETS) sowie die Organextrakte (Milzextrakt u. a.).

Seit dem Erscheinen dieser Zusammenstellung haben sich die experimentellen Resultate über Tumورهemmungen ausserordentlich stark vermehrt; wir kommen auf einige derselben später zurück.

Unsere Studien über Tumورهemmungen schliessen sich an zwei Ergebnisse bzw. Problemstellungen unseres Arbeitskreises an:

I. Oxydo-reduktive Prozesse und Cytochrom-Mangel in Tumoren

Es war nachgewiesen worden, dass die Konzentration an reduzierenden Stoffen, Ascorbinsäure, Dihydrocozymase, Cystein u. a. in Tumoren rel. hoch ist³, und andererseits konnten EULER u. H. HELLSTRÖM⁴ zeigen, dass in Sarkomen ein Mangel an den Komponenten des KEILIN'schen Cytochrom-Systemes besteht, so dass dem Tumor ein sehr niedriges Oxydoreduktionspotential zukommt. Wie in der genannten Monographie hervorgehoben wurde, wird der Wasserstoff im Sarkom also nur unvollständig auf Akzeptoren übertragen und zwar, wie erwähnt, wegen Mangel an Cytochrom.

Dass Oxydoreduktionssysteme bei der Tumorentwicklung und bei der Tumورهemmung eine wesentliche Rolle spielen kann nunmehr als feststehend betrachtet

¹ Nr. 1 dieser Serie: Dieses Arkiv 25 B Nr. 5 (1947).

² EULER u. SKARZYNSKI, Biochemie der Tumoren. Stuttgart, Enke 1941/42.

³ EULER, MALMBERG u. GÜNTHER, Z. Krebsforsch. 45, 5 (1937).

⁴ EULER u. H. HELLSTRÖM, Z. physiol. Chem. 260, 163 (1939). — Dieses Arkiv, 13 B Nr. 1 (1938).

werden. Da aber sowohl die kanzerogenen wie die krebshemmenden Tumorbestandteile oxydativ inaktiviert werden können, so liegen die Verhältnisse sehr verwickelt.

Zunächst ist in diesem Zusammenhang der Einfluss von *Chinonen* zu erwähnen.¹ CHALMERS und CROWFOOT² konnten schon 1941 nach Eingabe von Benzpyren in Ratten und Mäuse eine Substanz isolieren, die sich als 8-Hydroxy-3,4-benzpyren erwies. Dieses Oxydationsprodukt wurde dann von amerikanischen Forschern³ studiert, welche die Gegenwart von Chinonen nachwiesen. Es würde zu weit führen, hier auf die verschiedenen Wege hinzuweisen, auf welchen Chinone in das chemische Geschehen im Tumor eingreifen; es kann auf die neuere ausführliche Übersicht von HOFFMANN-OSTENHOF⁴ verwiesen werden; hervorzuheben ist der Befund von McCARTY und AVERY⁵, dass Chinone die Desoxyribonukleinsäure hemmen, sowie die Feststellung von AVERY⁶ und anderen Forschern bezgl. der Gegenwirkung von SH-Gruppen. In Enzymsystemen fungieren Chinone oft als Hemmstoffe (z. B. an Carboxylase; KUHN⁷).

Der Umstand, dass Tumoren oxydativ gehemmt werden, kann, wie früher hervorgehoben wurde, mit der Tatsache in Beziehung gesetzt werden, dass Benzpyren oxydativ angegriffen wird, und zwar sowohl von A-Vitamin (DITMAR⁸) wie auch von anderen Zellkomponenten. Die phenolischen Oxydationsprodukte von Benzpyren haben die krebsregende Fähigkeit des Kohlenwasserstoffes verloren.

Ascorbinsäure enthält bekanntlich eine Endiol-Gruppe und ist ein Redukton.⁹ Inwieweit andere Reduktone die Tumورهemmung beeinflussen ist noch nicht endgültig festgestellt. Benzpyren wird jedenfalls durch das typische Reagenz auf Reduktone, das Dichlorphenol-Indophenol, leicht oxydiert.

Ein Inhaltstoff der Tumoren, welcher als Redukton fungieren kann, ist das *Adrenalin*. Als Derivat des Brenzcatechins verhält es sich dem Tillmans-Reagenz gegenüber wie dieses, wird aber schneller oxydiert. Es bildet sich zunächst das Adrenalinchinon. Physiologisch wichtiger ist das Adrenochrom. Seine Rolle als Wasserstoffüberträger ist aber noch nicht ganz klargestellt. Das Oxydoreduktionspotential dieses biochemisch so centralen Stoffes wurde kürzlich von BRDIČKA untersucht. Wichtig sind die Gleichgewichte, welche einerseits zwischen Adrenalin und Ascorbinsäure (besprochen von LETTRÉ), andererseits zwischen Adrenalin und Vitamin A bzw. Carotin (EULER und KLUSSMANN) eintreten.

Vor 8 Jahren beobachteten EULER und MALMBERG und später EULER, RÖNNESTAM-SÄBERG und I. PETERSSON¹⁰ nach Adrenalin-Injektionen in sarkomtragende Ratten einen Rückgang des Jensen-Sarkomes bei etwa der Hälfte der injizierten Tiere. Das damals vorliegende Versuchsmaterial wurde einstweilen (1946) durch I. RÖNNESTAM-SÄBERG ergänzt, wobei die Adrenalin-Injektionen, und zwar in Dosen zwischen 200 und 800 γ jeden 5. Tag wiederholt wurden, und die erste Injektion

¹ Vgl. EULER, Veröffentl.-D. wiss. Inst. Stockholm, Nr. 2 (1945).

² CHALMERS u. CROWFOOT, Biochem. J. 35, 1270 (1941).

³ BERENBLUM, CROWFOOT, HOLIDAY u. SCHÖENTAL Cancer Res. 1 151 (1943).

⁴ O. HOFFMANN-OSTENHOF, Experientia 3, 137 (1947). — Wien. Sitz.Ber. 157 Heft 3-4, 274 (1947).

⁵ McCARTY u. AVERY, J. exp. Med. 81, 501 (1945).

⁶ AVERY, J. exp. Med. 79, 137 (1944).

⁷ KUHN, Chem. Ber. 80, 101 (1947).

⁸ DITMAR, Z. Krebsforsch. 50, 20 (1940).

⁹ EULER u. MARTIUS, Sv. Kem. Tidskr. 45, 73 (Februarheft) (1933). — Dieses Arkiv 11 B Nr. 14 (1933). — Lieb. Ann. 505, 73 (1933).

¹⁰ EULER, RÖNNESTAM-SÄBERG u. PETERSSON, Dieses Arkiv 20 A Nr. 12 (1944/45).

15 Tage nach der Überimpfung des Sarkoms an 22 Ratten (16 männliche und 6 weibliche) erfolgte. Es trat in 14 Fällen Rückgang des Sarkoms ein. „Mit dem Sarkom-Rückgang nahmen auch die Brenztraubensäure-Werte des Blutes wieder ab, ohne jedoch die normale Höhe zu erreichen.“

„Von besonderem Interesse schien uns hier die Frage, ob an dieser Hemmungswirkung des Adrenalins oxydative Einflüsse beteiligt sind, wie dies ja auch bei den ... Wirkungen des Colchicins der Fall zu sein scheint.“

An Wurzeln von *Allium Cepa* konnte der eine von uns (H. v. E.) durch Adrenalin bisher keine deutlichen Mitose-Wirkungen hervorrufen, ebenso wenig an Wurzeln von keimender Gerste.

In diesem Zusammenhang seien die bemerkenswerten Angaben von LETTRÉ¹ erwähnt, dass Adrenalin in einer Dose von 100 γ /ccm als Mitosegift bei Hühnerfibroblasten fungiert. Neuerdings erhielt LETTRÉ Mitosegift-Wirkung an Hühnerfibroblasten durch reines Adrenochrom in Mengen von 200 γ /ccm.

Da es, wie der eine von uns 1944 hervorhob, nahe liegt, Hemmungsstoffe der Tumoren auf ihre karyoklastische Wirkung hin zu untersuchen, haben wir besonders die Einwirkung von Colchicin auf Jensensarkom tragende Ratten² und auf Impftumoren studiert.

Die stark variierenden Resultate, welche wir sowohl in den schon früher mitgeteilten Versuchsreihen (Dieses Arkiv 20 A, Nr. 12) als bei neueren Versuchen erhielten, haben uns veranlasst, die Umstände, welche die Entwicklung von Tumoren beeinflussen, eingehender zu untersuchen. Wir haben zunächst eine längere Untersuchung über den Einfluss der Diät und besonders des Axerophthols (A-Vitamins) angestellt.

DITTMAR³ hat angenommen, dass die Bildung und Entwicklung von Tumoren durch den A-Vitamin-Gehalt der Gewebe stark beeinflusst wird und hat selbst Versuche über das Verhalten von Vitamin A zu kanzerogenen Substanzen ausgeführt. Nach DITTMAR wird die Entwicklung von Tumoren durch Zugabe von Vitamin A oder Carotin zu Benzpyren oder eine spätere Injektion von Carotin stark verzögert. Eine direkte Oxydo-Reduktion zwischen Benzpyren und Axerophthol kann immerhin in Betracht gezogen werden (vgl. S. 002). Wie schon 1945 mitgeteilt, wird nach den Erfahrungen unseres Arbeitskreises die Oxydationsgrösse des A-Vitamins *in vitro* erst durch grosse Mengen Benzpyren vermindert.

Die besonderen Einflüsse, welche das A-Vitamin auf die Entwicklung der Tumoren ausübt, haben veranlasst, beim Studium der Vitamin-A-Wirkung auf die Epithel-Entwicklung an die früheren Arbeiten des Instituts über Transplantationstumoren und über steroide Hormone⁴ anzuknüpfen. Insbesondere hat uns dabei die Beziehung interessiert, welche zwischen der Epithelveränderung bei A-Mangelkrankheit und den durch kanzerogene Substanzen erzeugten Veränderungen besteht.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit über die primären Wirkungen des Vitamins A sind BRACCO und EULER⁵ zum Ergebnis gekommen, dass die Dysfunktion der Schleimhäute die Hinderung des Wachstums bei A-Mangel bedingt, und dass der

¹ LETTRÉ, Naturwiss. 30, 39 (1942). — 33, 79 (1946).

² EULER, AHLSTRÖM u. HÖGBERG, Dieses Arkiv 16 A Nr. 5 (1942). — Z. physiol. Chemie 277 18 (1942).

³ DITTMAR, Z. f. Krebsforsch. 50, 20 (1940).

⁴ EULER, SÄBERG u. HÖGBERG, Z. f. physiol. Chem. 268 173 u. 235 (1941). EULER, AHLSTRÖM u. SKARZYNSKI, Dieses Arkiv 17 A Nr. 29 (1944).

⁵ Dass die Wachstumshemmungen, welche kanzerogene Substanzen an jungen Ratten hervorrufen (HADDOW, Nature 136, 868 (1935)), mit der bei A-Mangel eintretenden wesensgleich sind ist wenig wahrscheinlich.

A-Gehalt der Schleimhäute im wesentlichen durch den A-Gehalt der Mitochondrien bestimmt wird.

Wir gaben von unseren verschiedenen Serien, welche den Einfluss des A-Mangels betreffen, hier eine als Beispiel an, aus welchem die eingehaltenen Versuchsbedingungen ferner aber auch der Gang der Tumorentwicklung hervorgehen. Der Gang ist, wie aus den folgenden Tabellen ersichtlich wird, recht ungleich; manche Tumoren beginnen erst nach einer kürzeren oder längeren Induktionszeit zu wachsen, andere zeigen eine Tendenz zum Rückgang, worauf eine erneute Entwicklung einsetzt.

Diese und andere diätische Einflüsse interessieren uns auch in Zusammenhang mit unseren Versuchen über die FREUND-KAMINER'sche Reaktion. Bei der Prüfung derselben können sich natürlich oft diätische Einflüsse geltend gemacht haben, über deren Art und Grösse noch nichts bekannt ist.

Beobachtungen über die Tumorentwicklung Vitamin-A-arm ernährter Benzpyrensarkom-Ratten

Die zu den Parallelversuchen verwendeten *normal ernährten* Ratten erhielten die folgende Kost:

Täglich: Grundkost. Gleiche teile Milch und Wasser.¹

1 mal wöchentlich: Strömling. Hartes Brot. Morrüben, Grünkohl.

2 mal wöchentlich: Vitamintran (ca 1 000 A-Einheiten per g), ca 20 g per kg trockene Grundkost.

1 mal monatlich: Leber.

Die *Vitamin-A-arm ernährten* Tiere erhielten:

A. Täglich: Grundkost. Magermilch.

1 mal wöchentlich: Weisskohl. Hartes Brot.

1 mal monatlich: Strömling.

B. Täglich: Hartes Brot. Kartoffel. Magermilch.

1 mal wöchentlich: Weisskohl.

1 mal monatlich: mageres Ochsenfleisch.

Grundkost: 64,2 % Mais (Carotinarm); 32,1 % Weizenkleie, 3,1 % Casein. — 0,3 % NaCl, 0,3 % CaCO₃. Bäckerhefe. Wasser.

In 3 weiteren Versuchsserien wurden noch 48 Ratten in gleicher Weise untersucht. Wie ersichtlich ist der Einfluss der verminderten Vitamin-A-Zufuhr auf die Sarkom-Entwicklung *nicht* erheblich. Wie aus den obigen Angaben hervorgeht, ist die Kost der A-arm ernährten Ratten *keineswegs Vitamin-A-frei*, und es wäre möglich, dass sich ein stärkerer Einfluss *erst bei vollständigem* Vitamin-A-Entzug zeigt.

Das typische, von uns in *Tumoren* nachgewiesene Deficit an Cytochrom-System dürfte sich auch im Serum der Tumortiere geltend machen, und es bleibt in Betracht zu ziehen, dass die im normalen Serum vorhandene Substanz, welche die Zerstörung von Tumorzellen bewirkt und welche im Serum carcinomatöser Individuen fehlt mit dem in Tumortieren verminderten Oxydationssystem zusammenhängt.

Vitamin-A-Entzug der geimpften Sarkomratten.

Männchen Nr.	Anzahl Tage nach Impfung	Anzahl Tage nach A-Entzug	Gewicht der Ratte, g	Volumen der Sarkome, cem
I.	0	0	132	0
	12	0	175	0
	32	0	205	1,9
	39	0	220	6,7
	58	19	250	16,4
	65	26	250	43,2
	70	31	270	43,4
	72	33	277	45,0
	75	36	280	56,9
	77	38	285	61,2
	83	44	290	64,7
	86	47	300	83,9
	93	54	287	105,8
II.	0	0	132	0
	16	0	180	0,6
	32	0	180	2,9
	39	0	195	3,4
	58	19	222	5,3
	65	26	225	6,3
	70	31	235	9,4
	72	33	240	9,9
	75	36	245	10,1
	77	38	240	11,8
	83	44	240	11,0
	86	47	265	11,8
	100	61	250	17,1
	131	92	280	43,8
III.	0	0	130	0
	12	0	170	0
	32	0	195	2,0
	39	0	220	2,9
	58	19	230	5,5
	65	26	230	6,3
	70	31	240	8,9
	72	33	245	9,2
	75	36	240	9,2
	77	38	240	10,1
	83	44	240	11,6
	86	47	250	14,8
	93	54	245	22,8
	100	61	270	23,6
IV.	0	0	142	0
	12	0	180	0
	32	0	215	4,87
	39	0	230	12,0+ 1,8
	58	19	260	37,0+ 9,4
	65	26	274	68,0+ 11,1
	70	31	290	75,9+ 15,1
	72	33	300	82,1+ 16,0
	75	36	305	85,1+ 17,8
	77	38	310	87,4+ 20,7
	83	44	320	90,5+ 22,5
	85	46	320	104,2+ 26,6

(Forts.)

Männchen Nr.	Anzahl Tage nach Impfung	Anzahl Tage nach A-Entzug	Gewicht der Ratte, g	Volumen der Sarkome, ccm
V.	0	0	130	0
	12	0	180	0
	32	0	175	1,4
	39	0	180	2,8
	58	19	225	5,3
	65	26	230	9,8
	70	31	250	10,9
	72	33	250	11,6
	75	36	255	13,6
	77	38	255	17,6
	83	44	250	19,4
	86	47	260	24,3
	93	54	255	33,8
	99	60	270	37,7
VI.	0	0	100	0
	12	0	128	0
	32	0	165	6,0
	39	0	166	8,6
	58	19	185	5,4
	65	26	185	4,4
	70	31	200	3,7
	72	33	200	3,9
	75	36	205	2,8
	77	38	200	2,8
	83	44	200	2,3
	86	47	202	2,1
	93	54	195	1,8
	100	61	190	1,2
	125	86	200	3,1
	171	138	190	5,7
	181	142	180	8,3
	199	160	195	21,0
	209	170	205	33,9
	212	173	194	36,6

Überimpfung von Benzpyren-Tumoren auf Ratten von 40—50 g Gewicht.

Die Tiere wurden am 19. Dez. 1947 geimpft und erhielten von diesem Tag an eine A-arme Kost.

Männchen Nr.	Anzahl Tage nach Impfung u. A-Entzug	Gewicht der Ratte g	Volumen der Sarkome, cem
I.	0	52	0
	19	126	5,9
	26	158	17,6
	31	180	27,5
	33	190	32,5
	36	190	38,6
	38	190	50,6
	43	170	40,0
II.	0	42	0
	19	79	1,7
	26	100	4,7
	31	112	8,4
	33	128	10,7
	36	125	16,4
	38	128	21,3
	43	126	27,5
III.	0	50	0
	19	99	0,6
	26	112	1,6
	31	132	0,95
	33	144	0,7
	36	148	0,3
	38	145	0,25
	43	140	0
IV.	0	56	0
	19	120	0,8
	26	123	2,0
	31	145	2,8
	33	153	3,7
	36	165	4,9
	38	168	5,1
	43	170	8,2
V.	0	47	0
	19	95	2,1
	26	110	5,1
	31	129	9,0
	33	130	10,3
	36	135	8,7
	38	135	8,2
	43	135	4,0
VI.	0	52	0
	19	130	3,4
	26	152	5,0
	31	170	3,1
	33	180	2,3
	36	195	2,3
	38	190	1,6
	43	180	1,5
	46	180	1,5

Kontrollversuch mit normal ernährten Sarkomratten.

Männchen Nr.	Anzahl Tage nach Impfung	Gewicht der Ratte, g	Volumen der Sarkome, ccm
I.	0	128	0
	12	175	1,2+ 0,3
	16	180	1,7+ 0,8
	32	185	1,7+ 1,6
	39	198	1,7+ 1,5
	58	192	2,0+ 3,1
	65	224	2,5+ 3,6
	74	245	3,6+ 6,5
	78	250	4,1+ 8,4
II.	0	120	0
	30	152	3,9+ 4,3
	37	170	9,7+ 7,6
	43	225	14,8+ 11,4
III.	0	102	0
	11	142	1,3
	30	163	9,5
	37	200	15,8
	43	230	23,4
	49	277	25,5
IV.	0	100	0
	11	140	1,3
	30	162	4,7
	37	165	11,7
	43	227	20,3
	49	240	31,2
V.	0	145	0
	11	171	0,25
	30	180	2,3
	37	195	3,4
	46	215	3,2
	56	200	3,0
VI.	0	100	0
	11	140	1,3
	30	155	1,2
	37	175	1,6
	46	187	3,2
	56	200	2,8

II. Wuchsstoffe und Hemmungsstoffe der Tumorentwicklung

In einer früheren Zusammenfassung (EULER, D. wiss. Institut Nr. 2 (1945) S. 22) wurde die Beziehung zwischen den Wuchsstoffen und Vitaminen und die Rolle der Hemmungsstoffe als Antivitamine kurz besprochen. „Wir stützen uns auf die gut begründete Tatsache, dass tierisches und pflanzliches Wachstum nicht nur eine Anzahl von Enzymen für Energie- und Baustoff-liefernde Reaktionen erfordert, sondern auch Wuchsstoffe, und zwar gehen wir davon aus, dass auch die Wuchs-

stoffe, wie viele andere Ergone, nur in Verbindung mit je einem spezifischen hochmolekularen Apo-Enzym zur Wirkung kommen.“

Unter den Wuchsstoffen jeder Zelle nehmen die Nukleinsäuren eine besonders wichtige Stellung ein. Eine Reihe von antibiotischen Stoffen üben ihre Wirkung durch ihre Reaktion mit den Nukleinsäuren aus.

DISZFALUSY und EULER¹ sowie EULER und JAARMA² haben diese Rolle der Nukleinsäuren in vitro an *Escherichia Coli* sowie an Streptococcen studiert und besonders haben wir der Beziehung zwischen Nukleinsäuren und dem wichtigen Antibiotikum Streptomycin unsere Aufmerksamkeit gewidmet. Es hat sich durch die Untersuchungen von BRACCO³ und von HELLER³ gezeigt, dass Streptomycin ein sehr gutes Fällungsmittel für Ribonukleinsäure darstellt.⁴ Schon vorher konnten wir feststellen, dass auch die polyploidisierende Wirkung des Colchicins durch Ribonukleinsäure zwar nicht aufgehoben aber wesentlich erniedrigt werden kann. Dies ergab sich im Anschluss an unsere Keimungsversuche, welche besonders an Gerste und Roggen angestellt wurden.⁵ Auch die keimungshemmende Wirkung von Cumarin (vergl. R. KUHN u. Mitarb. Naturwiss. 43) fanden wir durch Ribonukleinsäure vermindert.

Wir haben schon früher⁵ auf die Versuche von McILWAIN⁶ an *Bact. Coli* hingewiesen, welcher die Beziehung zwischen Nukleinsäuren und Trypoflavin zeigte. LETTRÉ⁷ hat an diese Versuche angeknüpft und sie in Zusammenhang mit seinen an Colchicin gewonnenen Ergebnissen gesetzt. Auch LETTRÉ nimmt einen Antagonismus zwischen Nukleinsäuren und Trypoflavin an und führt die Aufhebung der Mitosegiftwirkung durch Nukleinsäuren darauf zurück.

Offenbar sehr geeignet zum Studium des Einflusses von Colchicin und anderer Mitosengifte ist die von LETTRÉ⁸ angewandte Methode der Gewebekulturen (Hühnerfibroplasten). W. v. MOELLENDORFF⁹ hat an Kaninchenfibrocyten den Einfluss zahlreicher Stoffe, besonders vieler Sexualhormone, geprüft.

Die Erwägung, dass an den Mitosen-Anomalien bzw. am Polyploidie-Effekt vielleicht eine Verdrängung der Wuchshormone beteiligt ist, haben uns veranlasst den Einfluss des Colchicins und anderer Stoffe auf die Vorgänge bei der Samenkeimung zu verfolgen, und dabei auch den Einfluss auf die Chromosomenzahl festzustellen. Hier sind die Entwicklungsreize durch 0,01 %ige Lösungen von Ribonukleinsäure zu erwähnen.

Im Anschluss an diese an anderer Stelle zu beschreibenden Ergebnisse wurde auch der Einfluss mehrerer antibiotisch wirksamer Stoffe im Tierversuch untersucht.

Die antibiotischen Wirkungen des Streptomycins sind wegen ihrer ausserordentlichen praktischen Bedeutung weitgehend bekannt und brauchen hier nicht näher besprochen zu werden. In unserem Arbeitskreis haben wir an *Escherichia Coli* die Anpassung dieser Bakterien an Streptomycin untersucht.¹⁰ Auf höhere Tiere ist die

¹ DICZFALUSY und EULER. Dieses Arkiv 24 A Nr. 38 (1947).

² EULER u. JAARMA, Dieses Arkiv 23 A Nr. 17 (1946).

³ BRACCO u. EULER, Kem. Arbeten Ny följd II Bd. 10 Nov. 1947 und März 1948.

⁴ EULER u. HELLER, Dieses Arkiv 26 A Nr. 14 (1948).

⁵ EULER, Dieses Arkiv 25 A Nr. 8 (1947).

⁶ McILWAIN, Biochem. J. 35 1311 (1941). — Brit. J. exp. Path. 22, 148, (1941). Modes of drug Action. Transactions Faraday Soc. 39, 12 (1943).

⁷ H. u. R. LETTRÉ, Naturwiss. 33. 283 (1946).

⁸ LETTRÉ, Z. physiol. Chem. 268 59 (1941).

⁹ v. MOELLENDORFF, Z. Zellforsch. 32, 1 u. 445 (1943).

¹⁰ DICZFALUSY u. EULER, Dieses Arkiv 25 B Nr. 4 (1947).

Injektionen von Alliin in Benzpyren-Sarkomratten.

Ratte Nr. geboren am	Datum	Gewicht g	Alliin subc. Inj.	Volumen der Sarkom, ccm	Bemerkungen
8827, Weibchen 19—21.X. 46	6.VI.	285		—	
	17.X.	240		2,73	
	7.XI.	260		31,9	
	12.XI.	260	5 mg	35,0	
	13.XI.	—	10 mg	42,6	
	15.XI.	285		—	Sarkom-Gew. 57 g. Blut untersucht.
8643, Weibchen 14.II. 47	9.IV.	100		—	
	25.IV.	152		Spuren	
	2.VII.	205		—	
	3.X.	225		Grosse Bohne	
	17.X.	238		0,94	
	7.XI.	240		6,00	
	12.XI.	225	5 mg	7,85	
	13.XI.	—	10 mg	—	
	20.XI.	244		9,00	
	26.XI.	245		24,5	
	28.XI.	250		32,8	
9172, Weibchen 26.VII.—2.VIII. 47	28.X.	145		—	
	8.XI.	155		Grosses Reiskorn	
	14.XI.	170	10 mg	1,58	
	17.XI.	172		1,34	
	22.XI.	220		6,66	
	26.XI.	190		10,4	
	28.XI.	210		12,8	
9174, Weibchen 18.—19.VI. 47	28.X.	154		—	
	8.XI.	168		Längl. Bohne	
	14.XI.	180	10 mg	2,05	
	17.XI.	190		3,00	
	20.XI.	225		7,28	
	26.XI.	202		13,8	
	28.XI.	205		23,2	Kleine eitrige Wunde.
9181, Weibchen 25.VII.—2.VIII. 47	28.X.	136		—	
	8.XI.	130		Bohne	
	17.XI.	130		3,17	
	20.XI.	130	5 mg	3,74	
	26.XI.	145		4,56	
	28.XI.	145		6,07	
9179, Weibchen 26.VII.—2.VIII. 47	28.X.	135		—	
	8.XI.	140		Langes Spur	
	17.XI.	143		2,02	
	20.XI.	149	1 mg	2,19	
	26.XI.	172		6,91	
	28.XI.	185		8,39	

Wirkung von Streptomycin auffallend gering. An Benzpyren-Sarkome tragenden Ratten konnte immerhin eine Hemmungswirkung konstatiert werden, auf welche wir an anderer Stelle zurückkommen.

In diesem Zusammenhang sei hier nur die Versuchsreihe mit *Alliin* erwähnt. Wir verdanken diesen kürzlich von A. STOLL¹ isolierten und konstitutionell aufgeklärten Stoff dem Entdecker. Nicht nur nach direkter Injektion des Alliins in 2-4 cem grosse Sarkome, sondern auch bei intramuskularer Injektion von 1-3 mg Alliin in sarkomtragende Ratten konnte, und zwar in 11 Fällen von 20 ein Rückgang und Verschwinden des Tumors konstatiert werden. Diese Versuche werden fortgesetzt.

Stockholm, Universität, Institut für organ.-chem. Forschung.

¹ STOLL, *Helv. Chim. Acta* 31, 189 (1948).

Tryckt den 2 april 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Unsaturated higher carboxylic acids. The synthesis of $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic, $\Delta^{22:23}$ -tricosynoic, and $\Delta^{21:22}$ -tricosynoic acids.

By EINAR STENHAGEN

In the course of studies on monolayer phase diagrams of long chain compounds it was of interest to study the effect of the introduction of a double or triple bond in a position at or near the end of the chain opposite the polar group. For this purpose three unsaturated C_{23} acids have been synthesized, viz. $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic acid, $\Delta^{22:23}$ -tricosynoic acid, and $\Delta^{21:22}$ -tricosynoic acid, together with the corresponding methyl esters and amides. The first mentioned acid was prepared by lengthening the chain of $\Delta^{10:11}$ -undecenoic acid (I). The latter acid was converted into *methyl 3-keto- $\Delta^{12:13}$ -tridecenoate* (V) by the modified BOUVEAULT—BONGERT—HUNSDIECKER procedure (1), as outlined in the chart (steps I $\rightarrow$ V). The yield of unsaturated β -keto ester was lower than that usually obtained in preparations starting from saturated acids, evidently because of some polymerization involving the terminal double bond. Alkylation of (V) with ethyl 11-iodoundecanoate (VI) under the usual conditions (cf. *e. g.* (2)), followed by hydrolysis and ketonic cleavage of the alkylation product (VII), gave *13-keto- $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic acid* (VIII), m. p. 86.5–86.7°, in a yield of 50 % of the theoretical. Reduction of the ketoacid by HUANG-MINLON's modification (3) of the WOLFF-KISHNER method gave *$\Delta^{22:23}$ -tricosenoic acid* (IX) in 79 % yield. The unsaturated acid has m. p. 75.1–75.2°.

The two acetylenic acids were prepared from (IX) by methods analogous to those used by KRAFFT (4) in the synthesis of the corresponding C_{11} acids. Bromination of (IX) in ether solution gave the dibromo-acid (X), which was not isolated in pure form. KRAFFT (4) showed that a bromo-acid of the type (X) on refluxing with potassium hydroxide in ethanol solution gives a mixture of ω -acetylenic acid and an unsaturated mono-bromo-acid. He considered that the latter acid had the bromine atom in ω -position, a conclusion later verified by HARRIS and SMITH (5). In the present case the only way of separating the desired ω -acetylenic acid (XII) from the unsaturated bromo-acid (XI) appeared to be via the silver acetylide of an ester of (XII), which might be expected to be very insoluble and thus allow the removal of the ester of (XI) by means of extraction with solvents. It was found that the separation could be accomplished in the manner indicated, viz. by extracting the methyl ester of (XI) from the acetylide (XIII) of the methyl ester of (XII) by means of ethanol and ether. Decomposition of the silver acetylide (XIII) gave pure *methyl $\Delta^{22:23}$ -tricosynoate*, (XIV), m. p. 62.9–63.2°. *$\Delta^{22:23}$ -Tricosynoic acid* (XII), m. p. 89.9–90.1°, was prepared by saponification of the ester in the usual way.

E. STENHAGEN, *Unsaturated higher carboxylic acids*

$\Delta^{21:22}$ -*Tricosynoic acid* (XV), m. p. 84.5–84.7°, was prepared by acetylenic rearrangement of (XII) caused by the prolonged action of aqueous potassium hydroxide at high temperatures (about 165°). Purification of the acid was carried out via the methyl ester. No trace of a precipitate was obtained when a solution of silver nitrate in ethanol was added to an ethanolic solution of the ester, indicating the complete conversion of (XII) into (XV).

Experimental.^{1, 2}

Methyl 3-keto- $\Delta^{12:13}$ -tridecenoate (V). This β -keto ester was prepared from undecenoic acid using a procedure exactly analogous to that used in the preparation of saturated long chain β -keto esters (1). Commercial undecylenic acid (LIGHT and Co., LTD.) was distilled through an efficient column (about 15 theoretical plates), and the fraction distilling at 147°, 3 mm, used for the β -keto ester synthesis. The β -keto ester was isolated by distillation. After two distillations and redistillation of the fore-run in the first distillation 25 g of *methyl 3-keto- $\Delta^{12:13}$ -tridecenoate* were obtained in the form of a colourless oil, b. p. 121–122°, 0.9 mm. The yield, calculated on the undecenoic acid used (92 g), was 21 % of the theoretical. A considerable quantity of undistillable residue was formed during the first distillation. The β -keto ester melted without further purification at 9°.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{14}H_{24}O_3$	(240.3)	C, 69.96; H, 10.07 %
Found		C, 70.01; H, 10.10 %

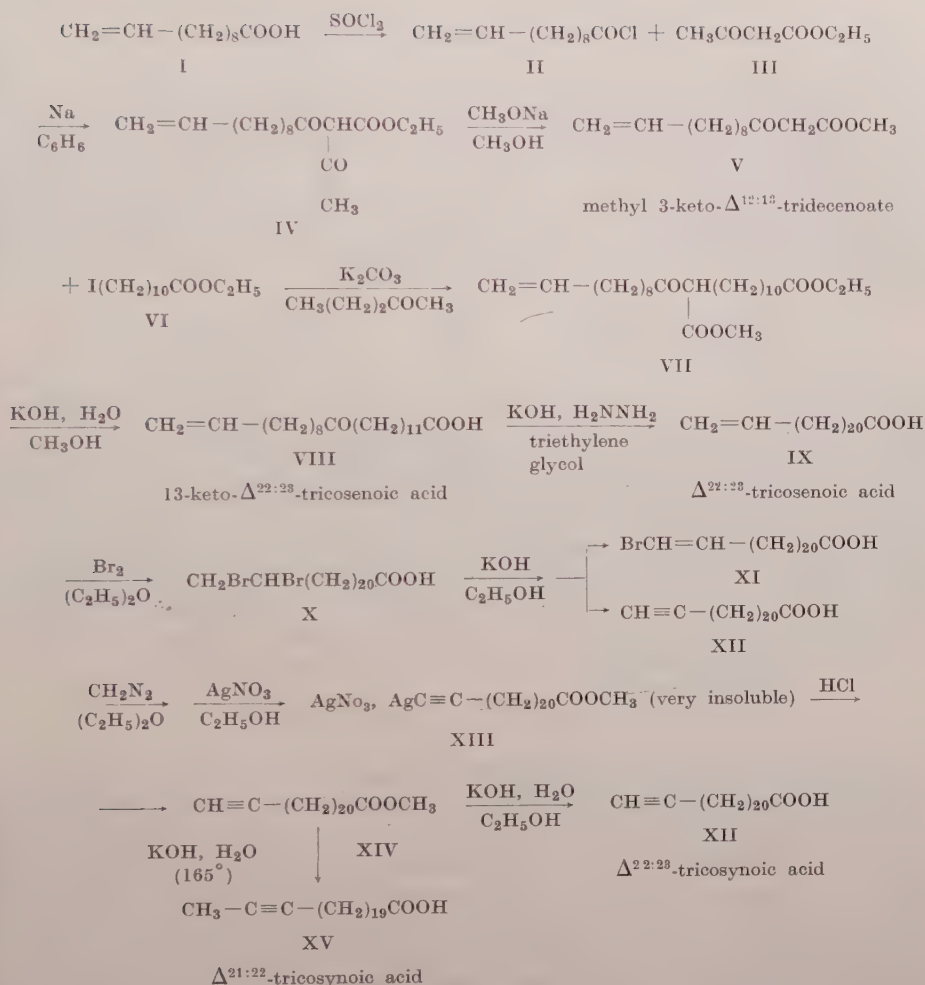
13-Keto- $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic acid (VIII). Methyl 3-keto- $\Delta^{12:13}$ -tridecenoate (25 g, 0.103 mole), ethyl 11-iodoundecanoate (35 g, 0.103 mole), dry potassium carbonate (35 g), and dry methyl-*n*-propyl ketone (150 ml) were boiled under a reflux (calcium chloride tube) for 15 hours. The mixture was acidified by means of dilute hydrochloric acid, ether added, and the ether solution washed several times with water. The solution was dried (sodium sulphate) and the solvents evaporated. The residue, a slightly yellow solid, was added to a solution of potassium hydroxide (70 g) in water (70 ml) and methanol (1050 ml). The mixture was kept at a temperature of 50° for 24 hours. The solution, which had deposited crystals, was acidified with dilute hydrochloric acid. The keto-acid was extracted with ether, the ether solution washed with water and the solvent evaporated. The residue was crystallized from acetone, giving 18 g (50 % of the theoretical) of *13-keto- $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic acid*, m. p. 85–86°. After further crystallization from acetone and from ethanol the m. p. was 86.5–86.7°. Long X-ray spacing (pressed or melted specimen) 61.8 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{42}O_3$	(366.6)	C, 75.38; H, 11.55 %
Found		C, 75.32; H, 11.55 %

$\Delta^{22:23}$ -*Tricosenoic acid* (IX). The keto-acid just described (3.5 g) was dissolved in triethylene glycol (25 ml) contained in a 50 ml round-bottomed flask. Potassium hydroxide (2.5 g) was added, a reflux condenser attached to the flask, and the mixture heated slightly in order to obtain a homogeneous solution. Hydrazine hydrate (2 ml of 85 %) was added through the condenser, more heat applied, and the mixture refluxed for one hour. The condenser was drained, and the temperature in the flask

¹ Melting points and crystal spacings were determined as described in previous papers from this laboratory (cf e. g. (1)).

Chart.



allowed to rise to 195° . Refluxing was then continued for one hour at this temperature. The contents of the flask was cooled to a temperature below 100° and poured into an excess of dilute hydrochloric acid. The reduced acid was extracted with ether, the ether solution washed and dried in the usual manner, and the solvent evaporated. Crystallization of the residue from ethanol gave 2.65 g (79 % of the theoretical) of $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic acid (IX) in the form of thin lustrous plates. The m. p. of the material thus obtained was $74.3\text{--}74.5^\circ$. Further crystallization from light petroleum (b. p. $40\text{--}60^\circ$) did not raise the m. p. significantly. When allowed to crystallize from a slowly evaporating solution in ether the acid was obtained in the form of beautiful rhombic plates arranged in a roof-brick fashion. The crystals melted at $75.1\text{--}75.2^\circ$. The same m. p. was found for crystals obtained by solidification of the melt. Long X-ray spacing (pressed specimen) $49.2 \text{ \AA}$.

E. STENHAGEN, *Unsaturated higher carboxylic acids*

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{44}O_2$	(352.6)	C, 78.34; H, 12.58 %
Found		C, 78.34; H, 12.53 %
Iodine number: Calcd 71.9; found (micro) 70.3.		

Methyl $\Delta^{22:23}$ -tricosenoate. The acid (120 mg) was dissolved in ether and a slight excess of diazomethane in ether solution added. Excess diazomethane and the ether were removed by evaporation, leaving a finely crystalline residue of *methyl ester* of m. p. 49.8–49.9°. The ester is very soluble in the common organic solvents. It was crystallized from acetone containing a small amount of water, from which solvent it separated in the form of thin, soft, lustrous plates. The m. p. was unchanged from that recorded above. Both pressed and melted specimens gave a long X-ray spacing of 29.1 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{24}H_{46}O_2$	(366.6)	C, 78.62; H, 12.65 %
Found		C, 78.41; H, 12.77 %

$\Delta^{22:23}$ -Tricosenamide. The acid (1 g) was dissolved in thiophen-free benzene (10 ml), oxalyl chloride (1 ml) added, and the mixture kept at a temperature of 50° for 4 hours. After this time the evolution of gas had ceased. Excess oxalyl chloride and the benzene were removed under reduced pressure on the water bath. Dry benzene was added, and the solution poured into aqueous ammonia kept at room temperature. After vigorous shaking for 10 minutes the amide was extracted from the mixture by means of hot benzene. After crystallization from benzene and from ethanol the *amide* (0.65 g or 65 % of the theoretical) melted at 108.2–108.5°. One further crystallization from benzene and one from methanol gave small light crystals melting at 108.4–108.5°. Previously melted material had the same m. p.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{45}ON$	(351.6)	N, 3.98 %
Found		N, 4.06 %

Methyl $\Delta^{22:23}$ -tricosynoate (XIV) $\Delta^{22:23}$ -Tricosenoic acid (5.5 g) was dissolved in ether (30 ml), and a slight excess of bromine in ether solution added at room temperature. After two hours at room temperature excess bromine and the ether were removed by evaporation. The yellow-brownish residue was recrystallized from ethanol at 0°, giving 5.5 g of crude dibromo-acid. The bromo-acid (5.5 g) was dissolved in ethanol (25 ml), a solution of potassium hydroxide (5 g) in ethanol (25 ml) added, and the resulting solution refluxed for 20 hours. The solution was acidified by means of hydrochloric acid, and the organic material extracted with ether. The ether solution was washed with water and dried (sodium sulphate). A slight excess of diazomethane in ether was added, and excess reagent and the ether removed by evaporation. The residue was dissolved in ethanol (about 50 ml). To this solution was stirred in a freshly prepared solution of silver nitrate (2 g) in hot ethanol (50 ml). In the first experiment it was found very difficult to filter off the precipitate formed. This difficulty was overcome by allowing the suspension to stand for half an hour, and adding ether to the ethanol suspension before filtration. The *acetylide*, which had a pure white, lustrous appearance, was washed on the filter with ethanol followed by ether. It was transferred to a flask and extracted with three portions of boiling ether. The acetylide was then collected and transferred to a separating funnel, ether and dilute hydrochloric acid added, and the mixture shaken until the acetylide had been decomposed. Prolonged shaking was necessary as the decomposition proceeds slowly, the white acetylide being replaced by a slightly

bluish-grey precipitate of silver chloride. The ether solution was washed with water and dried with sodium sulphate. The crystalline residue obtained after evaporation of the ether appeared visibly dimorphous. After crystallization from ethanol 2.06 g (36 % of the theoretical, calculated on the $\Delta^{22:23}$ -tricosenoic acid used as initial material) of methyl $\Delta^{22:23}$ -tricosynoate (XIV) was obtained in the form of large lustrous plates, m. p. 62.8–63.2°. Recrystallization of the ester from light petroleum (b. p. 40–60°) at 0° also gave lustrous plates with practically unchanged m. p., viz. 62.9–63.2°. On solidification of the melt the ester forms a transparent solid which melts at 59.6–61.0°. This crystal form is stable only near the m. p. On reheating solidified ester previously cooled to about 40°, remelting takes place at 62.8–63.2°. Long crystal spacing (stable form) 56.5 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{24}H_{44}O_2$	(364.6)	C, 79.06; H, 12.16 %
Found		C, 79.09; H, 12.20 %

$\Delta^{22:23}$ -Tricosynoic acid (XII). 0.6 g of the methyl ester was hydrolyzed by refluxing for 3.5 hours with potassium hydroxide (2.5 g), water (2.5 ml), and ethanol (25 ml). After acidification the acid was taken up in ether in the usual manner. The residue after evaporation of the ether was crystallized from a fairly large volume (400 ml) of light petroleum (b. p. 40–60°) containing an added small amount of light petroleum of b. p. 95°. $\Delta^{22:23}$ -Tricosynoic acid (XII) separated in the form of large, thin plates with a beautiful lustre. The plates were very easily electrified. The m. p. was 89.9–90.1°, unchanged after previous melting. Long X-ray spacing (pressed or melted specimen) 53.1 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{42}O_2$	(350.6)	C, 78.80; H, 12.08 %
Found		C, 78.87; H, 12.15 %
Iodine number: Calcd 72.3; found 70.9, 71.4.		

$\Delta^{22:23}$ -Tricosynamide. This amide was prepared in the same manner as the amide described above, starting from 200 mg of the acid. After crystallization from benzene 140 mg (70 % of the theoretical) of amide was obtained, m. p. 107.2–107.6°. Further recrystallization from ethanol and from benzene did not change the m. p. Polymorphism has not been observed.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{43}ON$	(349.6)	N, 4.01 %
Found		N, 3.95 %

Methyl $\Delta^{21:22}$ -tricosynoate. Methyl $\Delta^{22:23}$ -tricosynoate (0.95 g) was added to a water solution of potassium hydroxide (water saturated with potassium hydroxide at the b. p.) filling half the volume of a thick-walled Jena-glass tube. The tube (which had a total volume of about 60 ml) was sealed off and shaken at a temperature of 165° for 7 hours. After cooling to room temperature the tube was opened, the contents acidified by means of hydrochloric acid, and the organic material extracted with ether. After crystallization from light petroleum (b. p. 95°) 0.85 g of acid was obtained in the form of fine needles, m. p. 82–83°. The acid was dissolved in ether and esterified by means of diazomethane. When dissolved in ethanol the methyl ester gave no trace of a precipitate on the addition of a solution of silver nitrate in ethanol. The ester is extremely soluble in low-boiling light petroleum. Crystallization from 95 % ethanol at 0° gave 0.48 g of methyl $\Delta^{21:22}$ -tricosynoate, m. p. 47.3–47.7°. On cooling, the ester solidified at 43.8° (the temperature range of solidification was of the

E. STENHAGEN, *Unsaturated higher carboxylic acids*

order of 0.1°), and remelting took place at $43.9-44.0^\circ$, indicating a second crystalline form. The lower-melting form has a crystal spacing of $32.7 \text{ \AA}$. A pressed specimen of the higher-melting form gave a long spacing of $48.8 \text{ \AA}$.

<i>Anal.</i> : Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_2$	(364.6)	C, 79.06; H, 12.16 %
Found		C, 79.17; H, 12.21 %

$\Delta^{21:22}$ -*Tricosynoic acid* (XV). 0.38 g of the methyl ester was hydrolyzed by refluxing for 3.5 hours with potassium hydroxide (1.5 g), water (1.5 ml), and ethanol (15 ml). The hydrolysis mixture was worked up in the usual manner, and the acid crystallized from light petroleum (b. p. $40-60^\circ$). Yield 0.32 g of m. p. $83.8-84.0^\circ$. Further crystallization from acetone gave $\Delta^{21:22}$ -*tricosynoic acid* (XV) in the form of fine lofty needles, m. p. $84.5-84.7^\circ$. After solidification the acid remelted at the same temperature. Long X-ray spacing (pressed or melted specimen) $49.2 \text{ \AA}$.

<i>Anal.</i> : Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_2$	(350.6)	C, 78.80; H, 12.08 %
Found		C, 78.64; H, 12.04 %
Iodine number: Calcd 72.3; found 71.8.		

$\Delta^{21:22}$ -*Tricosynamide*. The amide was prepared from 106 mg of acid, using the usual procedure. After crystallization from ethanol the amide (86 mg or 81 % of the theoretical) melted at $113.8-114.1^\circ$. Further crystallization from benzene gave fine plates of m. p. $114.3-114.5^\circ$. A new crystal form of m. p. $115.6-116.0^\circ$ was obtained after previous melting.

<i>Anal.</i> : Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{ON}$	(349.6)	N, 4.01 %
Found		N, 4.02 %

The author is indebted to Fil. mag. KARIN LINDBLAD for the preparation of methyl 3-keto- $\Delta^{12:13}$ -tridecenoate. The microanalyses have been performed by Mr. W. KIRSTEN, Mr. I. ALPEROWICZ and Dr. H. MALISSA. Financial support from the ROCKEFELLER FOUNDATION is gratefully acknowledged.

SUMMARY

$\Delta^{22:23}$ -Tricosenoic acid has been prepared by lengthening the chain of $\Delta^{10:11}$ -undecenoic acid. The ω -acetylenic acid, *i. e.* $\Delta^{22:23}$ -tricosynoic acid, has been synthesized from the ω -olefinic acid via the dibromo-acid. $\Delta^{21:22}$ -tricosynoic acid has been prepared by rearrangement of the ω -acetylenic acid.

Institute of Medical Chemistry, University of Uppsala.

REFERENCES. 1. Ställberg-Stenhagen, S., *Arkiv för Kemi, Min. o. Geol.* 20 A, No. 19 (1945). — 2. Ställberg-Stenhagen, S., and Stenhagen, E., *Arkiv för Kemi, Min. o. Geol.* 19 A, No. 1 (1944). — 3. Huang-Minlon, J. *Amer. Chem. Soc.* 68, 2487 (1946). — 4. Krafft, F., *Berichte* 29, 2232 (1896). — 5. Harris, P. L., and Smith, J. C., *J. Chem. Soc.* 1935, 1572.

Tryckt den 2 april 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Effect of calcium ions on the agglutination in *Strongylocentrotus droebachiensis* Müll.

By ERIK VASSEUR

With 3 figures in the text

LOEB (1) states, that Ca-ions possess an almost specific action for fertilization of the sea-urchin egg, and it is important to note that they increase sperm agglutination also, according to the same author. In the course of my studies on the agglutination of sperm in different sea-urchin species, I have frequently met with this Ca-effect, but the action of Ca-ions has never been so pronounced as in *Strongylocentrotus droebachiensis*. These investigations will be dealt with in this paper.

Experimental

On the west coast of Sweden, *Strongylocentrotus droebachiensis* has its spawning-season from the middle or the end of February to March 20th–25th. The capability of the sperm to be agglutinated by egg-water and jelly-coat solution of the same species is not very pronounced in the earlier part of the season. In fact, Hagström and the author tried in vain, nearly the whole season of 1946, to obtain normal agglutination. Only a very strong activation was obtained (cf. fig 1). At the end of that season, however, the sperm showed beautiful spherical agglutination. This was increased strongly by the addition of isotonic CaCl_2 solution. It was also clearly demonstrated that the failure of agglutination at the commencement of the season was due to the sperm and not to the jelly-coat solution, inasmuch as the old jelly solutions which had not previously given any agglutination and which in the meantime had been stored in the refrigerator or in the freezing-box, showed good agglutination with sperm collected at the end of the season.

The calcium effect on agglutination was investigated more closely in 1948. It was found that egg-water sometimes gave an agglutination when the corresponding jelly solution did not. The addition of isotonic CaCl_2 solution strongly increased the cluster formation with egg-water (Fig. 2) and produced an even more powerful agglutination with jelly-coat solution.

In addition to the three-drop method, as described by VASSEUR and HAGSTRÖM (2), the following procedures were found to be extremely valuable. One or two drops of the test solution were pipetted on a slide. This was then placed on the graduated mechanical stage of a microscope and a drop of sperm suspension was added. Thus the reactions could be studied without any delay and the whole course of agglutination be followed. This procedure is more sensitive than the three-drop method.

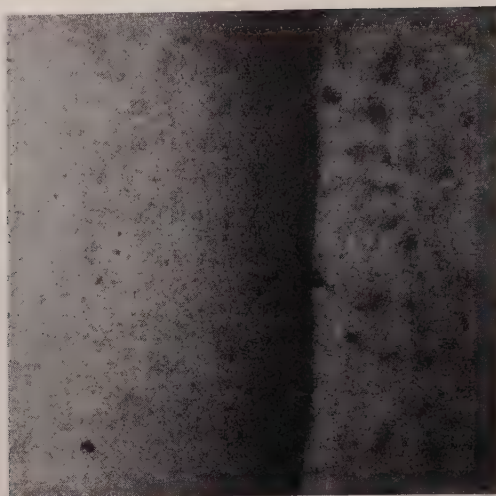


Fig. 1. Activation of sperm by jelly-coat solution; three-drop method: sea-water, sperm, jelly solution; in the figure the sperm is to the right, the jelly solution to the left, the sea-water it not shown; 75 $\times$.

Sometimes the different drops were shaken together instead. In this way bigger clusters were formed and the sensibility of the reaction was increased still more (cf. 2, p. 8). When the agglutination was to be photographed a cover-slip on clay feet was subsequently placed on the preparation.

Egg-water prepared from one female, which contained 90 per cent oocytes, showed no agglutination without but a very good and powerful agglutination after the addition of CaCl_2 solution when tested on March 12th. Three days later the same egg-water caused spermatozoa to agglutinate also without the addition of CaCl_2 . A sample of this egg-water dialysed for three days against distilled water and sea-water required, however, the addition of CaCl_2 in order to agglutinate sperm. In other experiments with dialysis of egg-water and of jelly no agglutinin was found in the outer solution. Thus it seems probable that the diminishing effect of dialysis on agglutination depends on the loss of a substance which improves but which does not cause agglutination. Most likely this substance is the activating dialysable substance, described by CORNMAN (3) and by VASSEUR and HAGSTRÖM (2).

The effect of Ca-ions was titrated on a series of egg-water and jelly-coat preparations from one batch of eggs. In this way some interesting results were obtained which elucidated the rôle of Ca. The experiment of March 17th to 19th will be described in more detail.

The eggs (about 200 ml) were filtered as usual through bolting silk. They were allowed to settle in two cylindrical-vessels (volume 1.3 l) filled with sea-water, and the egg-water was siphoned off. About 250 ml, just above the egg bulk, was collected separately, cleared by centrifugation and kept as egg-water 1 (E-W 1). The eggs were now put into one cylinder, allowed to settle in fresh sea-water and the supernate treated as before (E-W 2). The eggs were again suspended in half the volume of fresh sea-water, allowed to settle and the supernate siphoned off. The dense egg suspension was concentrated still more by careful centrifuging and the supernate collected (E-W 3).

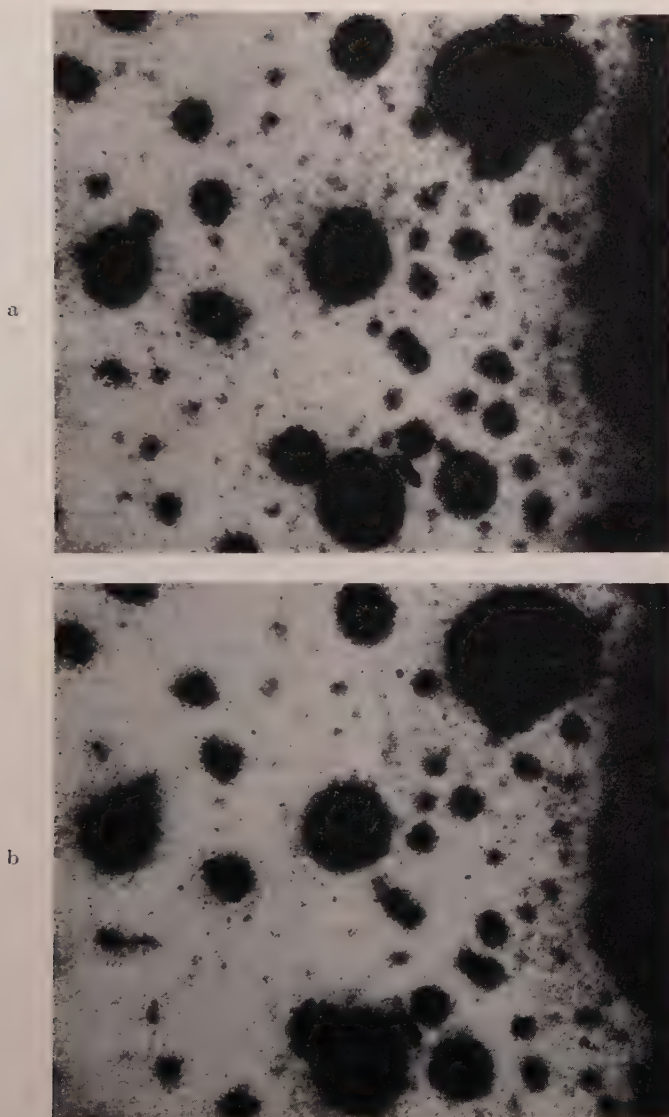


Fig. 2. Agglutination of sperm by equal amounts of egg-water and isotonic CaCl_2 solution; strength + (cf. Table 1); three-drop method; sperm to the right, egg-water + Ca to the left of the pictures; a. after 32 sec., b. after 44 sec.; $60\times$.

A few per cent of the eggs had lost their jelly coat by then. Already the second egg-water was quite clear.

The egg volume was now 160 ml. The jelly coat was dissolved by treatment with 9 ml. 0.1 N HCl (in sea-water) diluted with 140 ml sea-water. The jelly-coat solution was separated from the eggs by centrifuging and decanting. The eggs were resuspended in sea-water and poured into a

cylinder (volume 200 ml). The jelly solution was centrifuged strongly and resulted in a very beautiful, quite clear, colourless and somewhat viscous solution (J-S).

The jelly-free eggs sedimented to a volume of 20 ml. The supernate was decanted carefully and centrifuged (E-J 1 = Egg-water from Jelly-free eggs 1). The eggs were resuspended with the same volume of fresh sea-water, allowed to settle, resuspended and again allowed to settle before the supernate was decanted off (E-J 2). For the next egg-washing the eggs were allowed to settle three times and for the last egg-washing four times before the supernates were collected (E-J 3 and E-J 4).

These solutions were tested for their agglutinating power with and without the addition of equal amounts of isotonic CaCl_2 solution. For this purpose 3 ml sea-water was pipetted into a number of small test tubes. To the first tube 3 ml of the test solution was added, the contents of the tube thoroughly mixed, 3 ml transferred to the next and so on. In this way each tube contained half the concentration of fertilizin (agglutinin) of the preceding one.

Table 1.

Estimation of agglutination titer with and without the addition of isotonic calcium chloride solution.

Dilution	E-W 1		E-W 2		E-W 3		J-S		E-J 1		E-J 2		E-J 3		E-J 4	
	-Ca	Ca	-Ca	Ca	-Ca	Ca	-Ca	Ca	-Ca	Ca	-Ca	Ca	-Ca	Ca	-Ca	Ca
1	++								++		-		-		-	
1/2	-; ±	++					++		±		+	±	-			
1/4	-	+	±		+		++		-	++						
1/8		±	±		±	++	+		-	+						
1/16		-	-; ±	+	-	+	±	++	-	+						
1/32		-	-	+	-	+	-	++		-						
1/64		-	-	±; +	-	±		+								
1/128		-	-	-; ±		-		±								
1/256		-				-		±								
1/512								±; -								
Titer	1.5	8	12	96	8	64	16	384	2	16	-	2	-	-	-	-
Increase with Ca	5 ×		8 ×		8 ×		24 ×		8 ×		-		-		-	

- ++ strong agglutination
 + good agglutination
 ± weak, but distinct agglutination
 - no agglutination

When two signs are given, separated by a semi-colon, they denote the results of several experiments, giving different results; the first sign indicates the result of the majority of the tests.

The dilution series with jelly solution was kept over night in the refrigerator and retested with and without the addition of CaCl_2 . A remarkable increase of the titer without CaCl_2 was obtained: 1/32 : 1/64 : 1/128 = ; i. e. titer 64 instead of 16. The agglutination strength with CaCl_2 was unchanged at about 384. The difference in strength was thus reduced from 24 to 6 times, which was of the same magnitude as obtained with the different egg-waters.

Other experiments gave similar results. The effect of dilution on the agglutination of dialysed jelly-coat solution was not very pronounced, the addition of Ca increasing only 24 and 16 times in two different experiments with fresh dilutions. After the dilutions had been kept over night, the Ca-effect had decreased to 16 and 8 times, respectively.

At the very end of the spawning-season, the effect of Ca-ions was even more pronounced. In one case with egg-water tested on March 24th, the titer without Ca was 2, with Ca 256. The sperm showed very weak activity and required an unusually long time to attain a good motility after the concentrated dry sperm had been diluted.

In order to investigate which of the two main components of the jelly coat (cf. 4) might be responsible for the agglutinating power, the different egg-water and jelly-coat solutions of the experiment in Table 1 were analysed also for their content on polysaccharide and high-molecular nitrogen. An attempt was made to analyse the carbohydrate content of these solutions with the orcinol and sulphuric acid reaction (cf. 4, 5). However, this colorimetric reaction was by no means sufficiently sensitive for the original egg-water solutions. In order to obtain comparable results, all solutions were evaporated *in vacuo* to about one third of the original volume, dialysed against distilled water and further evaporated. A dilution series was prepared from each concentrated solution in the same manner as for the estimation of agglutination titer and these series were subjected to carbohydrate analysis with the orcinol reaction using the Beckman spectrophotometer, model DU. The density was read at the maxima and minima of the curve, i. e. at 380, 420 and 500 μ . The values obtained were proportional with the concentration in all cases except for egg-water 2. That which was left of the solutions was evaporated to dryness in small dishes in a drying oven (105°) to constant weight and the concentration of non-dialysable dry substance in the original solutions calculated (Table 2). The dry matter was analysed for total nitrogen (cf. 4). The carbohydrate values in table 2 are calculated on the assumption that the jelly solution contains 45 per cent polysaccharide (cf. 4).

The values of the agglutination titer compared with the carbohydrate and nitrogen content show some interesting results, but the chemical analyses cannot be considered absolutely correct, since they were preceded by some manipulations (evaporation and dialysis) which may have profoundly altered the essential composition of the solution. However, the carbohydrate content is comparable with the agglutination titer in most cases in spite of the great differences of the carbohydrate content of the dry matter. The nitrogen value is of the same magnitude as the agglutination titer only in one case, egg-water 3.

The figures on dry substance and agglutination titer make it possible to calculate the limit concentration of fertilizin giving agglutination (Table 3). The values given by WALLENFELS (6) for fertilizin action in *Arbacia lixula* are of the same magnitude, whereas the value given by TYLER (10, p. 185) for *Strongylocentrotus purpuratus* is slightly higher.

The eggs originally occupied a volume of 200 ml and 160 ml after the last washing and gentle centrifuging. From the values of dry substance of the egg-waters and the

Table 2.

	E-W 1	E-W 2	E-W 3	J-S	E-J 1	E-J 2	E-J 3	E-J 4
High-molecular dry substance p. p. m.	35.3	17.6	50.1	204.8	75.6	20.7	39.8	31.1
Polysaccharide p. p. m.	1.0	—	4.2	92.2	5.4	0.3	0.7	0.5
High-mol. N p. p. m.	1.2	0.2	1.3	8.0	2.0	0.5	0.3	0.7
Polysaccharide % of dry subst.	2.75	—	8.37	45.00	7.16	1.67	1.67	1.49
High-mol. N % of dry subst.	3.3	1.1	2.6	3.9	2.6	2.4	0.8	2.2
Dry substance J-S = 1.000	0.172	0.086	0.244	1.000	0.369	0.101	0.194	0.152
Polysaccharide J-S = 1.000	0.011	—	0.045	1.000	0.054	0.003	0.008	0.005
High-mol. N J-S = 1.000	0.150	0.025	0.162	1.000	0.250	0.063	0.038	0.088
Agglutination Titer + Ca J-S = 1.000	0.021	0.250	0.167	1.000	0.042	0.005	—	—

Table 3.

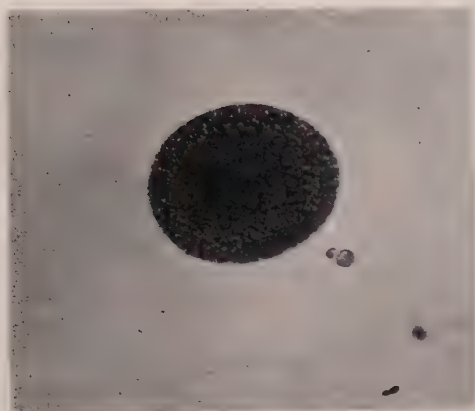
Concentration of high-molecular dry substance necessary to give agglutination.

	E-W 1	E-W 2	E-W 3	J-S	E-J 1	E-J 2
— Ca	1 : 0.04×10^6	1 : 0.7×10^6	1 : 0.16×10^6	1 : 0.3×10^6	1 : 0.03×10^6	—
+ Ca	1 : 0.2×10^6	1 : 5.5×10^6	1 : 1.3×10^6	1 : 1.9×10^6	1 : 0.2×10^6	1 : 0.1×10^6

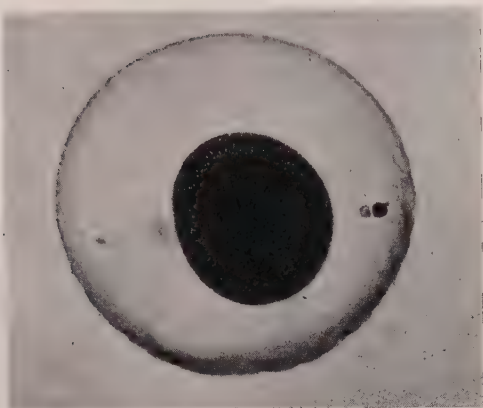
jelly solution it is evident that the jelly coat had swollen slightly more during the washings. It is possible to calculate the approximate dry content of one jelly coat from the data of the dry substance in the jelly solution (Table 2) and the volume and diameters of the eggs before and after the dissolution of the jelly coat.

If we first consider the egg with and without jelly to be an ideal sphere, the radius of the jelly-free egg = r , and that of the jelly-coated egg = R , then the volume of the jelly-free egg suspension is $n \cdot 8r^3 = 20$ ml, and that of the coated egg suspension is $n \cdot 8R^3 = 160$ ml (n = number of eggs). The volume of one single jelly coat is $4\pi(R^3 - r^3)/3$ and the volume of all jelly coats is $n \cdot 4\pi(R^3 - r^3)/3 = 73.3$ ml. The volume of the jelly solution was $160 + 9 + 140 - 20 = 289$ ml, containing 0.2048 mg dry substance per ml = 59 mg dry substance. In the form of jelly coat around the egg, this dry substance occupied a volume of 73.3 ml, *i. e.*, only 0.08 per cent of the jelly coat *in situ* was high-molecular dry substance.

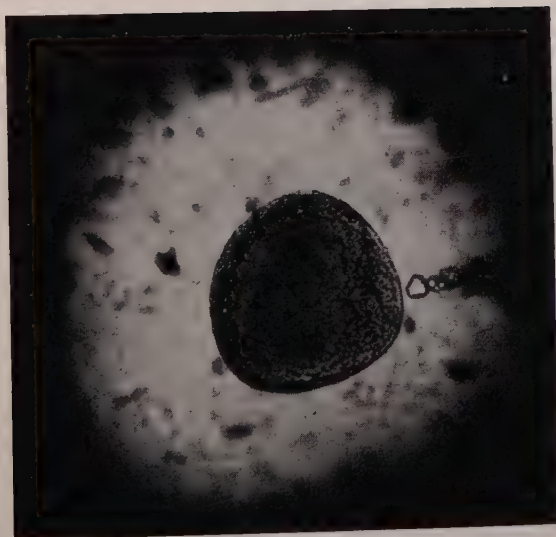
But since the eggs are not ideal spheres in a dense suspension (especially the jelly-coated eggs are compressed and deformed), the volume of the jelly coat is increased



a



b



c

Fig. 3. Eggs of *Strongylocentrotus droebachiensis* with swollen jelly coat. a The presence of the jelly coat is revealed by the situation of the polar bodies; $165\times$. b. The jelly coat is made visible by staining the outer border with toluidine blue; on one side, the jelly coat has started to shrink as a consequence of the staining; $165\times$. c. The egg is placed in a suspension of India ink in order to demonstrate the jelly coat; the polar bodies are seen in the micropyle; $200\times$.

from 73.3 to about 100 ml and the content of high-molecular dry substance is decreased to about 0.06 per cent.

The radius of a jelly-free *S. droebachiensis* egg, r , is about 0.068 mm (cf. fig. 3) and the radius of a not deformed jelly-coated egg, R , is 0.09–0.2 mm, depending on the

degree of swelling. In the present case, R was about 0.15 mm and the volume of one single jelly coat thus 12.8×10^{-6} ml, containing 7.7×10^{-6} mg high-molecular dry substance. A strongly compact jelly coat with $R = 0.09$ mm has a volume of 1.7×10^{-6} ml and contains 0.45 per cent high-molecular substance.

Discussion

The spermatozoa have to force their way through the jelly coat in order to reach the surface of the egg and to fertilize it. The question then arises whether this permeation is accomplished by mechanical means or whether the sperm make use of enzymes.

When the eggs are underripe, the jelly coat is often very compact in structure and forms an unusually hard obstacle for the sperm. Either the eggs are not fertilized at all or the membrane is very poorly elevated. By treating these eggs with glycine (cf. 7), some other amino acids (8), or serumalbumin, the membrane elevation is improved considerably. The jelly coat swells as a result of this treatment. It is probable, therefore, that a similar mechanism is involved in the normal ripening process of the egg, *i. e.*, that a protein or a peptide is secreted from the egg-surface and diffuses through the jelly coat.

The recent results of analyses on the jelly-coat substance (4, 9) show that in four different sea-urchin species (*Echinocardium cordatum*, *Echinus esculentus*, *Paracentrotus lividus*, and *Strongylocentrotus droebachiensis*) the jelly substance is composed of 20–25 per cent proteinlike material and 75–80 per cent polysaccharide, esterified by one sulphuric acid group at each monosaccharide residue. The amino acid values show some different proportions for the various species. Especially the irregular sea-urchin *Echinocardium cordatum* has rather deviating figures compared with the three regular species. But also the polysaccharide component is clearly different for all these four species. With the orcinol reaction and with paper chromatography the polysaccharide was shown to be composed entirely of fucose in *Echinocardium cordatum*, of fucose and glucose in *Paracentrotus lividus*, of fucose and galactose in *Strongylocentrotus droebachiensis*, and solely of galactose in *Echinus esculentus*. Most probably, *Strongylocentrotus purpuratus* jelly substance (10, 11) contains not only galactose but also fucose.

Investigations with periodate oxidation indicate that the sulphuric acid groups are evenly distributed over the whole polysaccharide molecule (12). This is confirmed by the metachromatic staining with toluidine blue and by the heparin-effect of the jelly (13). Calcium seems to dominate the cations (4, 9).

Measurements with the ultracentrifuge (14) and determinations of double refraction of flow (carried out in 1942 by Dr. Olle Snellman, Uppsala) on *E. cordatum* jelly gave values characteristic for elongated jelly-forming molecules. Thus, for the present, it seems difficult to calculate the molecular weight of the jelly substance.

The results of the chemical and physico-chemical analyses together with the morphological and physiological observations give the following hypothetical picture of the jelly coat *in situ*. The jelly coat is built up of lamellae, consisting of polysaccharide chains connected by calcium bridges between the sulphuric acid groups of the different chains. Very probably linkages also exist between a protein or peptide and the polysaccharide. These linkages are perhaps not only with the sulphuric acid groups but also between amino groups, especially the ϵ -amino group of lysine (15,

16, 17, cf. also 18), and the reducing end-group of the polysaccharide. This would explain the unusually firm association between the two main components, the carbohydrate and the protein.

During the ripening of the egg, a protein or a peptide is secreted from the egg-surface and diffuses through the jelly coat. During this process, calcium bridges are broken up, some of the sulphuric acid groups combine with the diffusing protein, and the jelly begins to swell.

If a spermatozoon has fertilized an egg before the protein or peptide has been secreted, the jelly substance situated nearest to the egg-surface will still have a strong coagulation-inhibiting action. This impedes the coagulation of the membrane (cf. 19), which therefore is not lifted up normally. During the diffusion of the protein the coagulation-inhibiting effect of the jelly will be neutralised.

The protein continues to diffuse through the jelly and finally reaches the outer border of it. Here, at the moment of dissolution, the protein is surrounded by polysaccharide molecules and these form a strong complex with the protein. These complexes are the fertilizin of the egg-water, capable of agglutinating the sperm of the same species.

When the jelly coat is dissolved by acid treatment, the calcium bridges are also broken up, resulting in both big and small complexes of polysaccharide with protein and perhaps also free polysaccharide molecules. Only the big complexes can agglutinate sperm, since a certain size of the agglutinin is necessary for this reaction. If the solution contains an excess of Ca-ions, new calcium bridges are formed and more big complexes originate. Thus the agglutinating power of the solution is increased. This effect is accomplished for example if the jelly-coat solution is diluted with sea-water. The Ca-content of sea-water will then be sufficient to increase the agglutinating power of the diluted solutions. This is clearly demonstrated in the experiments where the different jelly dilutions were kept over night. Normal egg-water, on the other hand, contains only the original fertilizin complexes, which are composed of comparatively little carbohydrate (cf. E-W 3 in Table 2) surrounding the diffusing protein, and contains no free polysaccharide molecules which can increase the size of small complexes when CaCl_2 is added. This means either that normally secreted fertilizin in the form of egg-water, at least in this species, has a higher agglutinating capacity than fertilizin in the form of dissolved jelly coat, or — more probably — that the jelly solution contains an excess of inactive polysaccharide groups, which only partly can be activated by Ca-ions as outlined above.

The egg-water solutions obtained after the dissolution of the jelly (E-J 1 to 4) are, in reality, only diluted jelly solutions. From the figures in Tables 1 and 2 it is evident that *S. droebachiensis* eggs, which have been deprived of their jelly coat, do not produce any fertilizin (cf. 10).

A sperm suspension when diluted with sea-water very soon loses its motility and capability of fertilization (20, 21). If, however, egg-water or jelly-coat solution are used as the dilution medium, the sperm remain mobile for a long time and maintain their fertilizing power. When a sperm suspension has ceased its motion, the addition of sea-water has no or only a very weak activating effect. On the other hand, the addition of egg-water and jelly solution usually causes a very pronounced activation (cf. e. g. 2, p. 5). These experiments show that egg-water and jelly solution contain one or more substances utilizable as nourishment for the sperm. Very probably, the jelly-coat substance itself, perhaps both the protein and the carbohydrate components, forms this food-stuff. This would mean that the spermatozoon possesses

enzymes capable of metabolizing these substances. The reversibility of the iso-agglutination could be explained by an enzymatic breakdown of this agglutinating substrate (cf. 22).

On addition of a sperm suspension to a mixture of CaCl_2 solution and jelly-coat solution the cluster formation and the activity of the sperm are strongly increased. This agglutination enhancing effect of calcium ions seems to depend on an increase of the number of linkages between the fertilizin complex and the surface of the sperm. Most probably, these linkages are calcium bridges between the sulphuric acid groups of the fertilizin-polysaccharide and acidic groups on the sperm surface. Naturally, the number of these calcium bridges will increase when calcium ions are added in excess. If the motility of the sperm is bad, as is the case especially at the end of the season, an addition of calcium ions together with the fertilizin solution will increase the agglutination titer more than usual (cf. the experiment of March 24th, p. 109) since fertilizin and calcium ions have an enhancing effect particularly upon the motility of old sperm (2, 12). Thus the sperm will be more disposed to agglutinate since a good motility of the sperm is necessary for the formation of agglutination clusters.

In hetero-agglutination, which is irreversible and mainly tail-to-tail, the substrate does not fit the enzyme and consequently is not broken down, *i. e.*, the spermatozoa remain united with each other. Moreover, the enzyme is probably only situated in the head and not in the tail, causing a firm persistent attachment tail-to-tail.

The species specificity of the sperm agglutination is very like a serological reaction between antibodies and antigens (cf. 23, 24, 10). Most probably, both the protein and the carbohydrate components are necessary for this reaction as outlined above. But in analogy with serological experiments it seems very likely that the principal specificity is related to the carbohydrate rather than to the protein component (25). Therefore, it is especially interesting to note the specific composition of the carbohydrate part of the four different sea-urchin species, *Echinocardium cordatum*, *Echinus esculentus*, *Paracentrotus lividus*, and *Strongylocentrotus droebachiensis*. The great deviation in amino acid composition of the *E. cordatum* jelly compared with that of the three regular sea-urchins (4) shows that also the protein component may be involved in this specificity. The differences in the protein part seem to be more primitive and may be group specific.

When the spermatozoa force their way through the jelly coat, very probably the loosening of the gelatinous texture is accomplished by the acidic action of the respiratory carbon dioxide on the calcium bridges rather than by an enzymatic breakdown of the protein or carbohydrate components. Of course, also the reversibility of the agglutination might, in the first place, depend on this action of the carbon dioxide. This would then also explain why sperm which have been agglutinated do not react again with fertilizin. In these spermatozoa a part of the first reacting fertilizin is still stuck to the surface, hindering other fertilizin complexes from becoming fixed.

When newly fertilized eggs are washed in order to get rid of the supernumerary sperm, the jelly coat is also removed. This demonstrates the very loose texture of the jelly after the permeation of the sperm. It is not at all improbable that this difference in rigidity depends on a dissolution of the calcium bridges through the action of respiratory carbon dioxide and the acid which is released at the moment of fertilization (26).

SUMMARY

In *Strongylocentrotus droebachiensis* the sperm is not agglutinated by jelly-coat solution at the beginning of the spawning-season, but towards the end of the season typical spherical clusters are formed.

The agglutination is strongly increased when isotonic CaCl_2 solution is added to the fertilizin solution. This effect of the calcium ions seems to depend chiefly on a facilitation of binding the fertilizin complexes to the sperm surface. The agglutination titer of a jelly-coat solution may be increased simply by diluting with sea-water and storing the dilutions for some hours. This might be caused by the formation of new active fertilizin complexes through the action of the Ca-ions from the diluting sea-water on otherwise inactive single polysaccharide molecules and too small, and therefore inactive, fertilizin complexes.

From chemical analyses on egg-water and jelly solution it seems very likely that the principal specificity of the fertilizin action is to be ascribed to the polysaccharide rather than to the protein component. Furthermore, the normally secreted fertilizin in egg-water seems to be more potent in cluster formation than the fertilizin obtained by acid dissolution of the jelly coat. Jelly-free *S. droebachiensis* eggs do not produce any fertilizin.

A tentative interpretation of the jelly-coat structure *in situ* and its rôle in fertilizin formation is given to account for the known facts of chemical and physico-chemical analyses, and of morphological and physiological observations.

In *S. droebachiensis* the limit concentration of fertilizin giving agglutination is of the order of $1:0.1 \times 10^6$ – $1:0.7 \times 10^6$ without and $1:1 \times 10^6$ – $1:5 \times 10^6$ with addition of Ca-ions.

The content of high-molecular dry substance in the jelly coat of a *S. droebachiensis* egg is about 0.05–0.45 per cent, depending on the degree of swelling. One single jelly coat contains about 7.7×10^{-6} mg high-molecular dry substance.

I wish to express my sincere thanks to the authorities of the Kristineberg Zoological Station of the Royal Swedish Academy of Science, Prof. Nils Holmgren and Dr. Gunnar Gustafson, for working facilities and generous supply of material.

This work has been supported by grants from C. F. Liljevalch J:rs stipendiefond, von Beskows stipendiefond, and the doktorand-stipendium of the Swedish Government.

From the Kristineberg Zoological Station, Fiskebäckskil, and Wenner-Gren's Institute for Experimental Biology, University of Stockholm.

REFERENCES. 1. Loeb, J., Science, N. S. 40, 316 (1914). — 2. Vasseur, E., and Hagström, B., Arkiv Zool. 37 A, No. 17 (1946). — 3. Cornman, I., Biol. Bull. 80, 202 (1941). — 4. Vasseur, E., Acta Chem. Scand. 2, 900 (1948). — 5. Vasseur, E., Acta Chem. Scand. 2, 693 (1948). — 6. Wallenfels, K., Österr. Chem.-Ztg. 43, 187 (1940). — 7. Wicklund, E., and Gustafson, T., Arkiv Zool. 42 A, No. 12 (1949). — 8. Runnström, J., Monné, L., and Wicklund, E., J. Colloid Sci. 1, 421 (1946). — 9. Vasseur, E., and Immers, J., Arkiv Kemi 1, No. 6 (1949). — 10. Tyler, A., Physiol. Revs. 28, 180 (1948). — 11. — Anat. Record 101, 658 (1948). — 12. Vasseur, E., unpublished experiments. — 13. Immers, J., and Vasseur, E., Experientia 5 124 (1949). — 14. Runnström, J., Tiselius, A., and Vasseur, E., Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 15 A, No. 16 (1942). — 15. Immers, J., and Vasseur, E., unpublished experiments. — 16. Stepanov, A. V., and Mamaeva, V. V., Biokhimiya 9, 10 (1944); Chem. Abst. 38, 5644^a (1944).

E. VASSEUR, *Strongylocentrotus droebachiensis*

- 17. Evans, R. J., and Butts, H. A., J. Biol. Chem. 175, 15 (1948). — 18. Wolfrom, M. L., Cavalieri, L. F., and Cavalieri, D. K., J. Am. Chem. Soc. 69, 2411 (1947). — 19. Runnström, J., Arkiv Zool. 40 A, No. 17 and No. 19 (1948). — 20. Gray, J., Brit. J. Exptl. Biol. 5, 362 (1928). — 21. Wicklund, E., Arkiv Zool. 42 A, No. 11 (1949). — 22. Vasseur, E., Arkiv Zool. 40 B, No. 3 (1947). — 23. Lillie, F. R., Problems of Fertilization, Chicago, 1919; J. Exptl. Zool. 16, 523 (1914). — 24. Tyler, A., Western J. Surg. Obstet. Gynecol. 50, 126 (1942). — 25. Goebel, W. F., Avery, O. T., and Babers, F. H., J. Exptl. Med. 60, 599 (1934). — 26. Runnström, J., Biochem. Z. 258, 257 (1933).

Tryckt den 2 april 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Zur Kenntnis tierischer Phosphatasen. V

Von B. EK, H. v. EULER und L. HAHN

Eines der wesentlichsten, seit mehr als 2 Decennien von verschiedenen Arbeitskreisen angegriffenen Probleme im Gebiet der Phosphatasen bezieht sich auf die prosthetische Gruppe der Phosphat-abspaltenden Enzyme, speciell der Phosphoesterasen. Die Existenz einer Co-Phosphatase ist zuerst im Anschluss an die Isolierung und Konstitutionsaufklärung der Cozymase erwartet worden. Bald hatte sich die Adenylsäure (Adenosin-5-phosphorsäure) als Co-Enzym der Phosphorylase erwiesen. Adenylsäure bildet nach Aufnahme einer PO_4 -Gruppe und Übergang in Adenylpyrophosphat einen Vermittler der Phosphatübertragung, wie aus den etwa gleichzeitigen Untersuchungen von LEHNARTZ¹, MEYERHOF² und LOHMANN³ hervorgeht.

Was das Enzym der reinen PO_4 -Abspaltung betrifft, so hat H. ALBERS⁴ die Annahme einer Co-Phosphatase zu stützen versucht, indem er eine Co-Enzymwanderung beschrieb, bei welcher eine Holophosphatase ihre Co-Phosphatase an eine zweite Apo-Phosphatase abgibt, so dass eine neue Phosphatase aufgebaut wird.

J. ROCHE⁵ hat 1944 die vorliegende Frage auf Grund eingehender Versuche wieder aufgenommen und konnte mit seinen Mitarbeitern an einer tierischen „alkalischen“ Phosphatase, welche durch Dialyse inaktiviert worden war, mittels 1-Alanin sowie mittels 1-Asparaginsäure in Gegenwart kleiner Mengen von Magnesiumsalz kräftige Aktivierungen erzielen. ROCHE bezeichnet diese Aminosäuren sehr korrekt als Aktivatoren.

Die gleiche Wirkung lässt sich auch durch andere Aminosäuren hervorrufen⁶, und zwar in verschiedenem Grade. Die bisher festgestellten Aktivierungsgrade bleiben aber anscheinend zurück gegen diejenigen, der durch Enzym-Kochsaft bzw. den daraus gewinnbaren Aktivator, das „Co-Enzym der Phosphatase“, erhalten wird. Die Festigkeit, womit dieser natürliche Aktivator (die natürlichen prosthetischen Substanzen) an der Apo-Phosphatase hängt, erschwert die genauere Beurteilung der Aktivierung durch Zusätze.

In der vorhergehenden Mitteilung III (26 A No 9) beschrieben wir die Aktivierung einer durch Dialyse von Co-Enzym⁷ teilweise befreiten Darmphosphatase-Lösung

¹ H. LEHNARTZ, Z. physiol. Chem. 184, 1 (1929).

² O. MEYERHOF, Naturwiss. 17, 283 (1929).

³ K. LOHMANN, Naturwiss. 17, 264 (1929). — Biochem. Z. 233, 460 (1931). — Ueber Specificität der alk. Darm-Phosphatasen siehe Gerh. SCHMIDT u. THANNHAUSER, J. Biol. Chem. 149, 369 (1943).

⁴ H. ALBERS, Z. angew. Chem. 49, 448 (1936).

⁵ J. ROCHE, N. van Thoai u. M. Roger, Trav. Soc. Chim. Biol. 26, 1047 (1944). — N. VAN THOAI, ROCHE et ROGER, Bioch. et Biophys. Acta 1, 61 (1947).

⁶ EK, EULER u. HAHN, dieses Arkiv 26 A No 9 (1948).

⁷ Wir bezeichnen im Folgenden den abtrennbaren Wirkungsstoff der alkalischen Darmphosphatase als „Co-Enzym“, ohne dass wir dadurch eine Hypothese über dessen Natur oder Funktion einführen wollen (Vgl. S. 127).

sowohl durch Aminosäuren als auch durch ein Dipeptid. Höhere Polypeptide wurden nicht untersucht, dürften aber nach den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen in Betracht kommen. (Vgl. S. 124).

Zur weiteren Charakterisierung der zu untersuchenden Wirkungsgruppe unserer Phosphatase schien eine Molekulargewichtsbestimmung den besten Anhaltspunkt zu liefern.

Zu diesem Zweck wurde eine Lösung des Co-Enzyms aus der Darmphosphatase auf Grund unserer früheren Erfahrungen dargestellt und auf ihre Wirksamkeit gegen dialysierte Phosphatase geprüft. Das Molekulargewicht der Substanz wurde in der Ultracentrifuge im Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Upsala untersucht.

Darstellung und Reinigung der Phosphatase

Aus frischem, gut durchspülten Kalbs-Dünndarm wurde die Schleimhaut abgeschabt und der schleimige Organbrei unter Zusatz des gleichen Volumens von 25 %igem Alkohol und 1/20 Vol. Toluol sowie 1/20 Vol. Äthylacetat bei Zimmertemperatur während 5 Tagen autolysiert. Dann wurde die Masse zentrifugiert und die annähernd klare Lösung mit 40 % Alkohol versetzt. Die inaktive Fällung wurde abgeschieden und die Restlösung mit Alkohol bis 65 % versetzt. Der Niederschlag wurde mit alkalisiertem Wasser bei 20° 12 Stunden extrahiert. Die so hergestellte Lösung IX wurde nun durch Elektrophorese im Apparat von HAHN und TISELIUS gereinigt (Lösung + 11).

50 ml der Lösung IX wurden in jede der Separationszellen gegeben. Als Pufferlösung wurde eine 0,01 mol. $\text{NH}_3\text{--NH}_4\text{Cl}$ -Lösung unter Zusatz von 40 mg Mg/Liter (pH 9,7) verwendet. Die Versuchsbedingungen der Elektrophorese waren: Spannung 150—440 Volt — Stromstärke 30 mA. — Zeit 48 Stunden. — Volumen der + Lösung nach der Elektrophorese 220 ml.

Die Aktivitätsmessung wurde an Na- β -Glycerophosphat durchgeführt.

Als Mass der Aktivität wurde die Grösse $\frac{100}{t \cdot v}$ gewählt; es bedeutet:

t = Zeit der Abspaltung von 10 % bzw. 20 % bzw. 30 % des Substratphosphors
v = Volumen der Enzymlösung.

Aktivitätsmessung

Substrat: Na- β -Glycerophosphat in Ammoniakpufferlös. mit Mg-Zusatz.

A. 0,2 ml + Lösung 11.

Min.	γ P	% abgesp. P
0	18,25	0
30	28,15	3,7
60	34,4	6,3
240	57,9	15,4

B. 0,3 ml Lösung IX.

Min.	γ P	% abgesp. P
0	27,3	0
30	—	—
60	60,7	13,0
240	129,0	39,5

Zeit der Phosphatabspaltung in Minuten

	10 %	20 %	30 %
A.	107	—	—
B.	42,7	99	168

		Aktivität per ml		Aktivität per mg	
A.	+ Lösung 11	4,67	—	—	6,37
B.	Lösung IX	7,82	3,71	1,98	1,95

Verhalten elektrophoretisch gereinigter Phosphatase bei der Dialyse

Es wurde früher gezeigt, dass bei der Dialyse von gereinigten Phosphatasepräparaten bei pH unter 5 eine allmähliche Inaktivierung des Enzyms statt hat, und dass die Aktivität durch Zusatz der Dialysen-Aussenlösung teilweise wieder hergestellt werden kann. Bevor wir auf eine Charakterisierung der Aussenlösung, des Co-Enzymes, näher eingehen, seien hier einige Versuche erwähnt, deren Zweck die Prüfung von Dialysaten auf Phosphatase-Aktivität war, die mit stark durchlässigen Membranen erhalten wurden.

Als Membranen-Material wurde einerseits Kuprophan (sehr dünne Cellophan-Membranen) und andererseits Kollodium verwendet. Das Resultat geht aus den folgenden Aktivitätsbestimmungen hervor.

Dialyse 3. Enzymlösung: + Lösung 10. Membran: Kollodium.

11 ml Lösung dialysiert gegen 18,2 ml Acetatpuffer, pH 4,5. Ionenstärke 0,005. Dauer 24 Stunden. Temp. 4°.

Aktivitätsbestimmung: Substrat: Na- β -Glycerophosphat in Ammoniakpuffer mit Mg-Zusatz. — Enzym: 18,2 ml Dialysat.

Minuten	0	30	60	240
γ P	20,2	20,3	18,0	20,3

Dialyse 11/1. Enzymlösung: + Lösung 11. Membran: Kuprophan.

46 ml Lösung dialysiert gegen 96 ml Acetatpuffer. pH 4,5. Ionenstärke 0,005. Dauer 5 Tage. Temp. 4°.

Aktivitätsbestimmung: Substrat: Na- β -Glycerophosphat in Ammoniakpuffer mit Mg-Zusatz. Enzym: 0,5 ml von 96 ml auf 5 ml im Vacuum eingeeengte Aussenlösung.

Minuten	0	30	60	240
γ P	21,2	23,2	22,2	21,2

Darstellung der Co-Phosphatase-Lösung D_y 11₁

46 ml + Lösung der Elektrophorese 11 wurden gegen 96 ml einer 0,005 mol. Acetatpufferlösung von pH 4,5 5 Tage lang bei 4° dialysiert. Die Aussenlösung wurde im Vacuum auf 5 ml eingeeengt: Lösung D_y 11₁.¹

Hierauf wurde die Innenlösung weiterhin 7 Tage gegen fließende Pufferlösung der gleichen Zusammensetzung bei pH 4,5 dialysiert.

Diese Innenlösung „dialys. + Lös. 11“ wurde zu folgender Messung der Co-Enzymwirkung der Lösung D_y 11₁ verwendet.

Substrat: Glycerophosphat in Ammoniak-Pufferlösung mit Mg-Zusatz.

¹ Die Lösung D_y 11₁ erwies sich gegenüber Na- β -Glycerophosphat als enzymatisch inaktiv (enthält also keine Phosphatase).

A. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11»

Min.	γ P	% abgesp. P
0	29,75	0
30	38,4	3,4
62	47,6	6,9
242	74,2	17,3

B. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11» + 0,2 ml
Lös. D_y 11₁

Min.	γ P	% abgesp. P
0	30,5	0
30	48,7	7,0
62	58,2	10,7
242	118,2	34,0

Zeit der Phosphatabspaltung in Minuten

10 % 20 % 30 %

A. 109 — —
B. 48 119 205

Aktivität per ml Enzymlösung

A. 1,84 — —
B. 4,17 1,67 0,975

A/B 2,27

Reaktivierung: 89 % des Ursprungswertes.

Co-Phosphatase-Wirkung der Lösung D_y 11₁ nach der Ultracentrifugierung

Die Lösung D_y 11₁ (eingeeengte Aussenlösung der Dialyse) wurde im Physikal.-Chemischen Institut der Universität Uppsala durch Herrn Docenten Dr. KAI PEDERSEN in der Separationszelle ultracentrifugiert. Durch die Ultracentrifugierung wurde eine obere und eine untere Schicht geschieden.

Die ursprüngliche Lösung (D_y 11₁) wurde im Verhältnis 1: 10 verdünnt: Lösung U₅.

Die untere Lösung bei der Ultracentrifugierung wurde mit etwa 1 ml Wasser und dann noch auf 5 ml verdünnt: Lösung N₅.

Die obere Lösung, welche 655,8 mg wog, wurde auf 5 ml verdünnt: Lösung O₅.

Die Co-Phosphatase-Aktivität sämtlicher Lösungen wurde unter Zusatz der teilweise inaktivierten Enzymlösung „dialys. + 11“ untersucht.

Substrat: Na- β -Glycerophosphat in Ammoniakpufferlös. mit Mg-Zusatz.

Lösung U₅.

Enzym: A. 0,5 ml »dial. + 11»

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	50,0	0
90	58,6	3,8
240	76,7	11,5

Enzym: B. 0,5 ml »dialys. + 11» + 1 ml U₅

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	53,3	1,5
30	60,7	4,7
90	63,2	5,7
240	102,8	22,7

Minuten 90 240
B/A 1,5 1,96

Lösung N₅ I.

A. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11»

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	23,45	0
35	36,5	5,1
95	43,9	8,0
241	71,2	18,5

Minuten 35 95

C/A 1,14 1,13

 C. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11» + 0,5 ml N₅

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	25,55	0,8
35	38,5	5,8
95	46,6	9,0
241	79,0	21,5

241

1,10 Mittelw. 1,14

 Lösung N₅ II.

A. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11»

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	31,3	0
30	40,2	3,4
60	45,8	5,6
240	55,95	9,5

Minuten 30 60

E/A 1,06 0,955

 E. 0,5 ml »dialys. + 11» + 0,2 ml N₅

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	31,4	0
30	41,0	3,6
60	45,1	5,35
240	56,2	9,6

240

1,01 Mittelw. 1,00

 Lösung O₅ I.

A. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11»

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	29,6	0
30	39,4	3,8
60	45,9	6,3
240	73,5	17,0

Minuten 30 60

D/A 1,18 0,915

 D. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11» + 0,5 ml O₅

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	32,95	1,3
30	41,2	4,5
60	44,4	5,7
240	91,0	23,8

240

1,4 Mittelw. 1,16

Lösung O₅ II.

A. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11»

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	28,6	0
30	32,8	1,6
60	37,55	3,5
240	49,5	8,1

Minuten 30 60
F/A 1,63 1,16

F. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11» + 0,2 ml O₅

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	28,3	0
30	35,4	2,6
60	39,0	4,0
240	53,9	9,8

240
1,21 Mittelw. 1,33

Lösung O₅ III.

A. 0,5 ml »dialys. + Lös. 11»

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	30,4	0
38	35,0	1,8
107	47,2	6,5
240	85,0	21,2

Minuten 38 107
G/A 1,17 0,83

G. 0,5 »dialys. + Lös. 11» + 0,1 ml O₅

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	30,6	0,1
38	35,9	2,1
107	44,2	5,4
240	90,5	23,3

240
1,1 Mittelw. 1,03

Herrn Docenten Dr. KAI PEDERSEN verdanken wir folgende Angaben:

Aus den Aktivitätsbestimmungen errechnet sich das Verhältnis der Totalaktivität (Co-Enzym-Aktivität) in der oberen und in der unteren Ultracentrifugenzelle zu $0,75 \pm 0,07$. Hieraus findet man die

Sedimentationskonstante $S = 0,31$ (0,20—0,42) SVEDBERG-Einheiten.

Unter der Annahme, dass die Moleküle sphärisch sind ergibt sich aus der Sedimentationskonstante und aus dem Wert 0,75 des spec. Volumens

das *Molekulargewicht* 900 (500—1500).

Für nicht sphärische Moleküle erhält man ein entsprechend höheres Molekulargewicht. Diffusionsmessungen deuten auf nicht-sphärische Moleküle hin.

Behandlung des Darmphosphatase-Kochsaftes mit Phosphorwolframsäure

Da nach dem Ergebnis der Ultracentrifugierung die Annahme nahe lag, dass die „Co-Phosphatase“ bezw. die aktivierende Komponente der dialysierten Phosphatase-Lösung und des aus der Darmphosphatase gewinnbaren Kochsaftes ein Polypeptid ist, wurde versucht, aus dem Kochsaft durch ein für Polypeptide charakteristisches Fällungsmittel, z. B. Phosphorwolframsäure, ein spezifisch wirksames Peptid zu isolieren. Tatsächlich konnte aus dem Kochsaft eine Fällung gewonnen werden, die aber nicht ausreichte um an der von der Phosphorwolframsäure abgetrennten Substanz eine Untersuchung der Wirkung vorzunehmen. Der bis jetzt angestellte Versuch muss also wiederholt und erweitert werden.

Fraktionierung eines Phosphatase-Kochsaftes

Der zur Herstellung einer Co-Phosphatase verwendete Kochsaft wurde in folgender Weise gewonnen:

Phosphatase wurde aus Darmschleimhaut dargestellt und elektrophoretisch gereinigt, wie auf S. 118 beschrieben. Auf diese Weise wurden in zwei Versuchen die Lösungen VI und VII erhalten.

110 ml Lösung VI und 90 ml Lösung VII wurden vereinigt und auf dem Wasserbad auf 20 ml eingengt und filtriert: Lösung Co 5.

1 ml dieser Lösung wurde mit so viel Alkohol versetzt, dass die Lösung daran 60 % war; die entstandene Fällung wurde abzentrifugiert und in 1 ml Wasser gelöst: Lösung Co 6.

Die rückständige Lösung wurde nun hinsichtlich der Alkoholkonzentration 70 %ig gemacht und wieder durch Zentrifugieren von der Fällung befreit. Die Fällung wurde in 1 ml Wasser gelöst: Lösung Co 7. Schliesslich wurde die Alkoholmenge auf 80 % erhöht und der Niederschlag abzentrifugiert und gelöst: Co 8. Der Rückstand wurde auf 1 ml eingedunstet: Lösung Co 9.

Die nachfolgenden Messungen der Co-Enzymwirkungen wurden mit Zuhilfenahme der durch Dialyse partiell inaktivierten Phosphatase „dial. + 7“ ausgeführt.

Substrat: Na- β -Glycerophosphat in Ammoniakpufferlös. mit Mg-Zusatz.

A. 0,4 ml »dialys. + 7«

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	19,0	0
30	35,7	6,4
60	53,5	13,4
240	117,0	18,0

B. 0,4 ml »dialys. + 7« + 0,2 ml Lös. Co 6

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	23,7	0
30	52,6	11,2
60	82,2	22,7
240	170,2	56,8

Zeit der Phosphatabspaltung in Minuten

	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
A.	45	106,6	179	—	—
B.	26,6	53	93	143	195

Aktivität per ml

A.	5,5	2,3	1,4	—	—
B.	9,4	4,7	2,7	—	—
B/A.	1,7	2,0	1,9		

C. 0,4 ml »dialys. + 7«

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	23,0	0
33	39,0	6,2
75	69,3	18,0
240	113,0	34,9

D. 0,4 ml »dialys. + 7« + 0,2 ml Lös. Co 9

Min.	γ P	% abgesp. P korr. f. 0-Wert
0	23,7	0
33	69,8	17,9
75	109,7	33,3
240	174,5	58,5

Zeit der Phosphatabspaltung in minuten					
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
C.	40	96	105	—	—
D.	17	38	65	105	173
Aktivität per ml					
C.	6,2	2,6	1,3	—	—
D.	14,5	6,6	3,9	2,4	1,5
D/C.	2,3	2,5	2,9		

Auch die Zwischenfraktionen Co 7 und Co 8, für welche wir die Aktivitätsmessungen der Raumersparnis wegen nicht ausführlich angeben, bewirkten eine deutliche Aktivierung der dialysierten Lösung + 7.

Ein deutliches Ergebnis hat der vorstehende Fraktionierungsversuch nicht geliefert. Sowohl aus der 60 %igen wie aus der 80 %igen alkoholischen Lösung wurden aktivierende Fällungen gewonnen, die aber ausser Peptiden auch Aminosäuren enthielten. Ob die aus 60 %iger Alkohollösung erhaltene Fällung eine geringe Menge eines Peptides enthält, das Apophosphatase stärker aktiviert als die aus konzentrierterem Alkohol ausfallenden Aminosäuren können wir nicht entscheiden.

Anhang

Zur Kenntnis der im pH-Gebiet 7—9 wirksamen Phosphatase und Nukleophosphatase aus Hefen

Im Anschluss an die neueren (siehe diese Serie I—IV) und älteren Untersuchungen unseres Arbeitskreises an Phosphatasen aus höheren Pflanzen¹ und aus Tierorganen², an welchen auch zunächst die Mg-Aktivierung nachgewiesen wurde³, teilen wir hier einige neue Versuche über „alkalische“ Hefenphosphatasen mit, die sich hauptsächlich auf die ev. Existenz einer „Co-Phosphatase“ (eines natürlichen spezifischen Aktivators) beziehen.

In den *Hefen* dürften die von A. HARDEN⁴ entdeckten Kohlenhydratphosphatasen als Komponenten des Enzymkomplexes der Gärung die Hauptrolle spielen. Neben ihnen kommen nach einem Befund von NEUBERG⁵ auch Glycerophosphatasen in den Hefen vor. Ihre Untersuchung wurde hier durch eingehende Versuche von H. und E. ALBERS aufgenommen, welchen man eine Reihe neuer Beobachtungen, sowohl über „saure“ wie „alkalische“ Hefen-Glycerophosphatase verdankt.

Bezüglich der im sauren Gebiet bei pH 3,3 an β -Glycerophosphat wirksamen Phosphatase stellten H. u. E. ALBERS⁶ fest, dass die Oberhefe 8–9 mal mehr enthält als die Unterhefe. Sie fanden in Oberhefe nur eine Phosphatase mit einem breiten Wirkungsoptimum zwischen pH 3 und 4,5.

¹ H. u. B. EULER, Z. physiol. Chem. 92, 292 (1914).

² EULER, Z. physiol. Chem. 79, 375 (1912).

³ H. ERDTMAN, Z. physiol. Chem. 172, 182 (1927). — 177, 211 (1928).

⁴ A. HARDEN u. W. J. YOUNG, Proc. Roy. Soc. 82, 327 (1910). — A. HARDEN, *Alcoholic Fermentation* (London, 1932).

⁵ C. NEUBERG u. KARCZAG, Biochem. Z. 36, 60 (1911).

⁶ H. u. E. ALBERS, Z. physiol. Chem. 232, 165, 189 (1935). — Dieses Arkiv 12 B No 3 (1935).

Die von SCHÄFFNER u. ERWIN BAUER¹ aus Bierhefe gewonnene Phosphatase spaltete bei pH 6.4 ganz überwiegend die α -Form des Glycerinphosphates. Nach PETT und WYNNE², HOMMERBERG³ und W. SCHUCHARDT⁴ lässt sich die nahe am Neutralpunkt wirksame Glycerophosphatase (sowohl α - als β) aus Hefen, besonders Unterhefe verhältnismässig leicht abtrennen. Nach H. und E. ALBERS haftet dagegen die im sauren Gebiet wirksame Phosphatase, die sehr reichlich in Oberhefen vorkommt, ausserordentlich fest an den Zellbestandteilen. „sie geht bei der Autolyse oder bei der Extraktion von Trockenhefe nur zu einem geringen Teil in Lösung.“

Sehr bemerkenswert ist der Befund von H. und E. ALBERS, dass die β -Oberhefenphosphatase durch Mg-Ionen nicht aktiviert, sondern durch steigenden Zugaben von Magnesiumionen in steigendem Mass gehemmt wird. Sie scheint somit in ihrem Wesen der von DAVIES (1934) beschriebenen Milzphosphatase nahestehen. Auch bei Veränderung der Acidität fanden H. und E. ALBERS die Oberhefenphosphatase durch Mg-Ionen *nicht* aktiviert; indessen sind diese Versuche nur im Gebiet pH = 3.45 bis 6.72 durchgeführt worden. Bei unseren Versuchen, welche meist im Gebiet pH 7.5—9 ausgeführt wurden, findet Mg-Aktivierung statt. Dies ist für tierische Phosphatasen mehrfach von J. ROCHE⁵ und von JENNER u. KAY⁶ bewiesen.

In einer Untersuchungsreihe „Zur Kenntnis tierischer Phosphatasen“ wurde die Aktivität gereinigter Darmphosphatase-Präparate vergleichend an β -Glycerophosphat⁷ und an gereinigtem Ribonukleinat Boehringer geprüft.⁸ Für die Aktivität per mg Trockensubstanz hatten wir die folgenden Werte gefunden:

Gepprüft an	Aktivität per mg Trockensubst.
Ribonukleinat	87,7
β -Glycerophosphat	21,1

Ein analoger Vergleich⁹ der an Oberhefen-Phosphoesterase, und zwar bei pH 6,0 angestellt wurde, ergab einen wesentlich kleineren Unterschied, allerdings an einer schwächeren Phosphatase-Lösung. An gereinigten, dialysierten Darm-Phosphatase-Präparaten hatten wir in Bestätigung der Befunde von ROCHE (l. c.) Aktivierung durch Alanin, aber gleichgrosse Aktivierungen auch durch andere Aminosäuren ferner durch die im *Hefekochsaft* enthaltene *Phosphatase* gefunden.

Ein diesbezüglicher vergleichender Versuch mit „alkalischer“ Oberhefephosphatase ergab die viel geringere Abtrennbarkeit eines Aktivators von Aminosäure-Charakter von einer „Apo-Phosphatase“.

Bei den erwähnten Arbeiten über Hefenphosphatasen (Hefen-Phosphoesterasen) sind verschiedene Isolierungsmethoden sowohl an Oberhefe als an Unterhefe angewandt worden. Meistens wurde die Abtrennung der Phosphatasen durch Autolyse

¹ A. SCHÄFFNER u. ERWIN BAUER, Z. physiol. Chem. 232, 66 (1935).

² L. B. PETT u. A. M. WYNNE, Biochem. J. 28, 365 (1933).

³ C. HOMMERBERG, Sv. Kem. Tidskr. 47, 63 (1935).

⁴ W. SCHUCHARDT, Biochem. Z. 278, 164 (1935).

⁵ J. ROCHE, Bull. Soc. Biol. 24, 1237 (1942). — 25, 1157 (1943).

⁶ H. D. JENNER u. H. D. KAY, J. Biol. Chem. 93, 733 (1931).

⁷ Wir verdanken das β -Glycerophosphat Herrn Dr. O. BAILLY, Montreuil-sur Bois.

⁸ EK, EULER u. HAHN, IV, 26 B, No 10 (1948).

⁹ Die Bestimmung des Verlaufes der PO_4 -Abspaltung, welche colorimetrisch im Stufenphotometer geschah, wurde in $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ -Pufferlös. bei pH 9 unter Zugabe von Mg ausgeführt. Bezgl. der Einzelheiten der Methodik vgl. Experientia, 3, S. 412 (1947).

eingeleitet. In einem Teil unserer Versuche haben wir ebenfalls die Hefe unter verschiedenen Bedingungen autolysiert.

Bei der Wahl der zunächst anzuwendenden Verfahren zur Freilegung und Isolierung der Hefenphosphatase sind wir ausgegangen von der Arbeitsweise, welche wir mit Erfolg zur Isolierung der tierischen Phosphatase, speciell der Darmphosphatase verwendet hatten.¹ Es ist wohl möglich, dass die Weiterführung dieser Versuche zu besseren Extraktionsresultaten führt.

Als Mass der *Aktivität* geben wir die Zeit an, die zur Abspaltung von 5 % Phosphat-P durch 1 ml Lösung erforderlich ist.

Wir teilen nun eine kurze Übersicht über die Gewinnung der Hefenphosphatasen in folgenden Tabellen mit, von welchen sich die erste auf Oberhefe (Bäckerhefe von Stockholms Norra Jästfabrik), die zweite auf eine Unterhefe von der Hamburger-Brauerei in Stockholm bezieht.

Tabelle 1.

Frische Oberhefe (Trockengew. 24,3 %).

Autolyse	Nachfolgende Behandlung		Zeit f. Abspalt. von 5 % P
Verrieben mit 15 ml 25 %-ig. Alkohol + Toluol + Äthylacetat, 19 Stund. bei 20°	Weiter autolysiert 1 Tag bei 37°	Gefällt mit 65 %-ig. Alkohol	37 Min.
	Weiter autolysiert 5 Tage bei 20°	Die Fällung 14 Stund. mit alkalin. Wasser ge- schüttelt	220 Min.

Tabelle 2.

Frische Unterhefe (Trockengew. 19,8 %).

Vorbehandlung	Autolyse	Weitere Behandlung	Zeit f. Abspalt. von 5 % P
Verrieben mit Glycerin + Glaspulver, 2 St. 20° steht 15 St. bei 0°	Nicht autolysiert	Gefällt mit 65 %-ig. Alkohol. Fällung 14 St. mit alkalin. Wasser extrahiert	44 Min.
Verrieben mit Glycerin + Glaspulver	Autolysiert 7 Tage mit 25 %-ig. Alkohol + Toluol + Äthyl- acetat	Gefällt mit 65 %-ig. Alkohol. Fällung extrahiert mit al- kalin. Wasser	Inaktiv
Ohne Verreibung	»	»	Inaktiv
Verrieben mit Glaspulver	Nicht autolysiert	Extrahiert mit alka- lin. Wasser	33 Min.

Die geringere Abtrennbarkeit eines Aktivators steht vielleicht damit in Zusammenhang, dass die Hefenphosphatase keiner so gründlichen elektrophoretischen Reinigung unterzogen worden war wie die Darmphosphatase. Auch Roche fand schon, dass die Abspaltung eines Aktivators um so rascher verläuft, je reiner das Enzym war.

¹ EK, EULER u. HAHN, Dieses Arkiv III, 26 A No 9 (1948).

ZUSAMMENFASSUNG

Einen bindenden Schluss über die Existenz und Natur eines als prosthetische Gruppe funktionierenden Teiles der alkalischen Darmphosphatase können wir auf Grund unseres bisher vorliegenden Materiales noch nicht ziehen. Die Versuche an „Co-phosphatase“-Lösungen müssen noch wesentlich erweitert werden.

Kombiniert man die in dieser Serie mitgeteilten Resultate mit früheren, insbesondere von J. ROCHE erbrachten, so wird man zum Schluss kommen, dass ein Beweis für die Abtrennbarkeit einer eigentlichen prosthetischen Gruppe dieser Phosphatase nicht erbracht ist. Wenn die Phosphatase unter Schwächung der Aktivität durch Dialyse einen Bestandteil von Aminosäure- oder Polypeptidcharakter verliert, so dürfte derselbe *aus dem Enzym-Protein* abgetrennt worden sein, wodurch der Beitrag des Proteins zur Aktivität der „Holophosphatase“ vermindert wird.

In ähnlicher Weise dürften sich hydrolysierende Enzyme überhaupt bei der Dialyse bezw. Hydrolyse¹ verhalten.

Nimmt man an, dass die aus der Phosphatase abgetrennte, in der Ultracentrifuge untersuchte „Co-Phosphatase“ ein Polypeptid ist so würde sich aus dem gefundenen wahrscheinlichen Molekulargewicht etwa ein Hexapeptid ergeben.

Dem Vorstand des Physikalisch-Chemischen Institutes der Universität Upsala, Herrn Prof. Dr. THE SVEDBERG, sowie Herrn Docenten Dr. KAI PEDERSEN, welcher die Freundlichkeit hatte, die Messungen an der Ultracentrifuge auszuführen und zu berechnen, sprechen wir hier unseren verbindlichsten Dank aus.

Stockholm, Universität, Institut für organ.-chem. Forschung.

¹ Vgl. EULER, Chem. Ber. 55, 3583 (1922).

Tryckt den 2 april 1949



Über die Schardingerdextrine

I. Oxydation des β -Dextrins mit HJO_4 . Saure Hydrolyse

Von KARL MYRBÄCK und TORSTEN JÄRNESTRÖM

Mit 2 Figuren im Text

Die sog. Schardingerdextrine sind, von mehreren Gesichtspunkten aus betrachtet, sehr interessante Stoffe. Sie sind die einzigen Abbauprodukte der Stärke mit mehr als zwei Glucoseresen pro Molekül, die in wohlkristallisierter Form gewonnen werden konnten. Sie müssen durch eine Enzymwirkung (oder möglicherweise durch ein Zusammenwirken mehrerer Enzyme) entstehen, die sonst gar nicht bekannt ist. Aus den grundlegenden Untersuchungen K. FREUDENBERGS (1-6) geht hervor, dass sie als ringförmige Gebilde aufzufassen sind, die aus Glucoseresen bestehen, welche durch α -glycosidische 1,4-Bindungen („Maltosebindungen“) verknüpft sind. Die Ringe können in der Stärke nicht vorgebildet vorliegen, sondern sie müssen aus längeren, offenen Ketten durch eine mit einer Ringschliessung irgendwie gekoppelten Spaltung hervorgehen. Aus ganz kurzen Ketten, wie z. B. den durch die α -Malzamyase (und andere α -Amylasen) erzeugten α -Dextrinen, werden keine Schardingerdextrine gebildet. Dies zeigt, dass ihre Bildung, in anderen Worten die Ringschliessung, mit der Spaltung längerer Ketten zwangsweise gekuppelt ist, was wohl auch ein Beweis dafür ist, dass Spaltung und Ringschliessung von einem und demselben Enzym bewirkt werden.

Es wurde schon früher darauf hingewiesen, dass die Bildung der Schardingerdextrine als eine Umglucosidierung betrachtet werden kann. Wenn z. B. das Enzym eine längere Kette vom nicht reduzierenden Ende aus angreift (was allerdings nicht notwendig der Fall zu sein braucht), so kann angenommen werden (vgl. die Abbildung 1), dass das Enzym auf seiner Oberfläche einige endständige Glucoseresen der Kette ringförmig anzuordnen und die in der Abbildung mit einem Pfeil angedeutete Umglucosidierung zu bewirken vermag; die bei der Spaltung zu erwartende freie „reduzierende“ Gruppe tritt mit dem Hydroxyl 4 des in unmittelbarer Nähe befindlichen endständigen Glucoseresen zu einer neuen α -glucosidischen Bindung zusammen. Das Enzym könnte also eine Art „Transglucosidase“ sein, prinzipiell nicht unähnlich der Transglucosidase aus *Pseudomonas saccharophila*, die von HASID, DOUDOROFF und Mitarbeiter näher studiert worden ist (7, 8). Während dieses Enzym anorganisches Phosphat, Ketozyucker und 1-Arabinose (möglicherweise auch andere Stoffe) als „Acceptoren“ verwenden kann, so wäre im Falle des Maceransenzymes anzunehmen, dass aus räumlichen Gründen die 4-Stellung des endständigen Glucoseresen bei der Transglucosidierung im Wesentlichen als Acceptor infrage kommt. Aus ganz anderen Gründen ist ja angenommen worden, dass unverzweigte

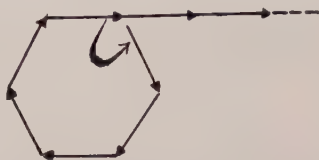


Abb. 1.

Ketten von Glucoseresten mit Maltosebindungen mit Vorliebe eine Spiralform mit etwa sechs Glucoseresten pro Windung annehmen (9). Diese Spiralform erklärt ja u. A. die Fähigkeit der Amylose Jod zu binden, ebenso wie die Ringform der Schardingerdextrine die Bildung ihrer Addukte mit Jod, organischen Lösungsmitteln usw. erklärt.

Die Schardingerdextrine reduzieren Fehlingsche Lösung und ähnliche Reagenzien nicht; dagegen verbrauchen sie bei der Aldosenbestimmung nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL beträchtliche Mengen von Jod. Unsere Versuche bestätigen völlig die diesbezüglichen Angaben von FREUDENBERG (3, 5). Wir fanden, dass das β -Dextrin von alkalischem Hypojodit so stark angegriffen wird, wie wenn es pro Molekül mehr als eine freie reduzierende Gruppe enthielte. Wahrscheinlich ist zu schliessen, dass in den Schardingerdextrinen Alkoholgruppen oxydiert werden. Warum dies eben bei den ringförmigen Dextrinen so ist, während in Aldosen mit offenen Ketten die alkoholischen Hydroxyle gegenüber Hypojodit stabil sind, ist allerdings augenblicklich völlig unverständlich. Dieses Verhalten der Schardingerdextrine verhindert u. A. eine genaue jodometrische Bestimmung der während einer Hydrolyse der Dextrine freigesetzten reduzierenden Gruppen.

Die Schardingerdextrine geben bei der sauren Hydrolyse 100% Glucose. Dass sie wie erwähnt Fehlingsche Lösung nicht reduzieren, muss darauf beruhen, dass sie ringförmig gebaut sind und nicht etwa darauf, dass die reduzierende Gruppe eines kettenförmigen Saccharids mit einem Alkohol veräthert oder mit einer Säure verestert ist. Aus den vollmethylierten Dextrinen wird nämlich bei der Hydrolyse nach FREUDENBERG nur 2, 3, 6-Trimethylglucose gebildet (4).

Die Schardingerdextrine werden von den gewöhnlichen Amylasen (Malz, Pancreas, Speichel usw.) nicht angegriffen. Dagegen enthält *Bacillus macerans* wahrscheinlich ein Enzym, das die Schardingerdextrine spalten und zwar grösstenteils in Maltose überführen kann, denn MYRBÄCK und GJÖRLING (10) beobachteten, dass bei Versuchen unter Toluol mit Kulturfiltraten von *Bac. macerans* die anfangs in grosser Ausbeute gebildeten Dextrine wieder unter Maltosebildung verschwanden. Wenn auch in diesem Falle die absolute Reinheit der Bakterienkultur nicht völlig sichergestellt war, so erscheint jedoch wahrscheinlich, dass *Bac. macerans*, der ja unter geeigneten Umständen aus Stärke grosse Mengen von Aceton und anderen Gärprodukten zu bilden vermag, die anfangs aus Stärke entstehenden Schardingerdextrine weiter verarbeiten kann.

Dass die β -Amylase die Schardingerdextrine nicht angreift, erscheint durchaus verständlich. Es kann ja gegenwärtig als festgestellt betrachtet werden, dass dieses Enzym die spaltbaren Substrate nur von einer freien, nicht reduzierenden Endgruppe her angreift (11). Da in den Schardingerdextrinen keine Endgruppen vorhanden sind, so tritt auch keine Anlagerung der Amylase und keine Spaltung ein. Weniger gut verständlich ist die Tatsache, dass auch die α -Amylasen wie z. B. die α -Malzamyrase, völlig wirkungslos sind. Wir stellen uns gegenwärtig vor (11), dass dieses Enzym die spaltbaren Kettenmoleküle der Stärke, Amylose usw. weit von

Endgruppen und von solchen unabhängig anlagern und spalten kann. Wenn die Schardingerdextrine nur Maltosebindungen enthalten, so ist zunächst nicht recht einzusehen, warum sie von den α -Amylasen nicht gespalten werden. Im Falle der α -Malzamyase wurde zwar in Arbeiten aus diesem Laboratorium (12) gezeigt, dass das Enzym zu Ketten länger als etwa 8 Glucoseresten eine viel höhere Affinität hat als zu kürzeren Ketten und dementsprechend die längeren Ketten mit einer viel grösseren Geschwindigkeit spaltet. Aber auch die kürzeren Ketten werden, obgleich mit einer niedrigeren Geschwindigkeit gespalten, was ja schon daraus hervorgeht, dass die anfangs bei der Stärkespaltung mit α -Malzamyase entstehenden α -Dextrine allmählich verzuckert werden. Eigentlich sollte man deshalb erwarten wollen, dass auch die Schardingerdextrine vom Enzym angegriffen werden sollten. Da dies offenbar nicht der Fall ist, so ist, wenn man an der Annahme festhält, dass die Schardingerdextrine nur Maltosebindungen enthalten, anzunehmen, dass die Ringform der Moleküle die Anlagerung des Enzyms verhindert. Im Falle einer in Lösung frei beweglichen offenen Kette kann diese eine für die Anlagerung an das Enzym notwendige Form annehmen, was bei einer ringgeschlossenen, mehr oder weniger starren Anordnung der Glucosereste vielleicht nicht möglich ist.

Durch Röntgenanalyse kamen KRATKY und SCHNEIDMESSER (13) zum Ergebnis, dass das α -Dextrin Schardingers aus fünf, das β -Dextrin aus sechs Glucoseresten besteht. Später haben FRENCH und RUNDLE (14) ähnliche Messungen ausgeführt, aus welchen hervorzugehen scheint, dass das α -Dextrin sechs, das β -Dextrin sieben Glucosereste pro Molekül enthält. Wie von FREUDENBERG (15) neuerdings hervorgehoben wird, scheint die völlige Reinheit der von FRENCH und RUNDLE untersuchten Präparate nicht gesichert: Die spezifischen Drehungen ihrer Präparate waren höher als die von FREUDENBERG bei sehr sorgfältig gereinigten Präparaten gefundenen (vgl. auch unten den von uns gefundenen Wert der spezifischen Drehung des β -Dextrins), und der Aschengehalt war beträchtlich. Die von FREUDENBERG und Mitarbeiter dargestellten kristallisierten Methyläther der Schardingerdextrine geben bei der Molekulargewichtsbestimmung in Kampher Werte, die mit den oben erwähnten Ergebnissen von KRATKY und SCHNEIDMESSER sehr gut übereinstimmen.

Der Umstand, dass die Hydrolyse der Schardingerdextrine nicht ohne weiteres durch Reduktionsbestimmung mit Hypojodit ermittelt werden kann, erschwert in hohem Grade die diesbezüglichen Untersuchungen. Selbstverständlich können mit Fehlingscher Lösung, anderen Kupferreagenzien, dem Ferrizyanidreagenz von HAGEDORN und JENSEN usw. sehr gut reproduzierbare Werte erhalten werden. Da aber bei unvollständiger Hydrolyse ein Gemisch von Glucose, Maltose und höheren Sacchariden vorliegt, so hat man eigentlich keine Möglichkeit eine genaue Berechnung des Hydrolysegrades, d. h. der relativen Zahl freigesetzter, reduzierender Gruppen vorzunehmen.

Von SWANSON und CORI (16) wird behauptet, dass der Hydrolysegrad von Polysacchariden mit einem bestimmten stark alkalischen Kupfercarbonatreagenz genau bestimmt werden kann. Sie stützen diese Auffassung auf Versuchen, in welchen gezeigt wird, dass unter bestimmten Bedingungen die saure Hydrolyse der Amylose, durch Reduktionsbestimmungen mit dem erwähnten Reagenz ermittelt, monomolekular verläuft und zwar mit genau derselben Geschwindigkeitskonstante wie die Spaltung der Maltose unter denselben Bedingungen. Die von SWANSON und CORI angeführten Versuche sind aber keineswegs beweisend: Dass die Geschwindigkeitskonstanten der Spaltung von Maltose, Amylose und Amylopektin in den Versuchen von SWANSON und CORI gleich sind, ist ein Zufall und hängt sicher damit

zusammen, dass die Hydrolyseversuche in konzentrierter Salzsäure ausgeführt wurden. Als hydrolysierendes Agens für Saccharide ist diese ungeeignet; man denke nur, dass in konzentrierter Salzsäure „Reversion“ von Glucose d. h. Bildung höherer Saccharide in grossem Ausmass stattfindet (17). Zwar war die Saccharidkonzentration in den Versuchen von SWANSON und CORI niedrig; es erscheint trotzdem nicht möglich daraus Schlüsse über die Kinetik der Spaltung zu ziehen. Die weitere Annahme, die von SWANSON und CORI als selbstverständlich betrachtet wird, nämlich dass die Hydrolysegeschwindigkeit einer 1,4- α -glucosidischen Bindung von deren Lage im Saccharidmolekül, oder anders ausgedrückt, von der Kettenlänge des Saccharids, unabhängig sein sollte, trifft bestimmt nicht zu. Sowohl von FREUDENBERG (3, 18) (Versuche in 51 % Schwefelsäure) wie von MYRBÄCK und Mitarbeiter (19) (Versuche in verdünnter Schwefelsäure bei höherer Temperatur) ist gezeigt worden, dass die mittlere Hydrolysegeschwindigkeit eines Saccharids vom Maltosetypus mit steigender Kettenlänge derselben regelmässig zunimmt, so dass die Hydrolysegeschwindigkeit der Bindung in der Maltose etwa 50 % grösser ist als die der Bindungen in einer sehr langen Kette wie der der Amylose. Nach FREUDENBERG lässt sich die Hydrolysekonstante k_n eines Saccharids vom Maltosetypus mit n Bindungen nach der Formel

$$k_n = \frac{k_2 + (n - 1) k}{n}$$

recht genau berechnen. In der Formel bedeutet k_2 die Konstante der Maltosehydrolyse und k die Konstante der Spaltung einer Bindung weit von Endgruppen eines höheren Saccharids. Die Hydrolysegeschwindigkeit eines Polysaccharids vom Maltosetypus ist deshalb bedeutend niedriger als die der Maltose, und bei der Spaltung aller Saccharide der Maltosereihe ausser der Maltose steigen die nach der monomolekularen Formel berechneten Koeffizienten immer ganz deutlich an. Dass dies in den Versuchen von SWANSON und CORI nicht der Fall ist, muss damit zusammenhängen, dass die konzentrierte Salzsäure irgendwelche spezifischen Wirkungen ausübt.

In dieser Untersuchung wurde der Hydrolysegrad entweder so bestimmt, dass die Reduktionswerte nach BERTRAND als Glucose berechnet wurden, wobei bestimmt ein gewisser Fehler entsteht, oder auch so, dass nach der Hydrolyse das noch vorhandene Ausgangsmaterial (Schardingers β -Dextrin) mit Trichloräthylen ausgefällt wurde, worauf die Reduktion nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL bestimmt und in Anzahl freigesetzter, reduzierender Gruppen umgerechnet werden konnte. Wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht, ist die Löslichkeit der Trichloräthylenverbindung des β -Dextrins so klein, dass dieses Verfahren zulässig erscheint, wobei allerdings wegen der in Lösung gebliebenen Mengen des Dextrins eine gewisse Korrektur an die Werte des Hypojoditverbrauches angebracht werden muss.

Löslichkeit der Trichloräthylenverbindung

Die in der Tabelle 1 angegebenen Mengen des β -Dextrins wurden in je 50 ml Wasser gelöst. Die Lösungen wurden mit je 3 ml Trichloräthylen 40 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und dann 72 Stunden unter zeitweiligem Umschütteln bei + 2° stehen gelassen. Dann wurde kalt zentrifugiert, und von den klaren Lösungen wurden je 20 ml mit Schwefelsäure in der Siedehitze vollständig hydrolysiert, worauf die entstandene Glucose mit Hypojodit bestimmt wurde.

Tabelle 1.

mg β -Dextrin	mg Glucose gefunden
50,1	5,5
90,2	5,4
185,6	5,0

Die Versuche zeigen also, dass pro Liter mit Trichloräthylen gesättigten Wassers eine Menge β -Dextrin als Trichloräthylenverbindung in Lösung bleibt, die etwa 0,26 g Glucose entspricht. (Es ist natürlicherweise nicht ohne weiteres anzunehmen, dass diese Zahl z. B. von einem Salzgehalt der Lösung unabhängig sein sollte.)

Das in dieser Untersuchung angewendete β -Dextrin wurde wie gewöhnlich durch Behandlung etwa fünfprozentiger Stärkekleister mit Enzym (20) aus *Bac. macerans* unter Toluol dargestellt und mit Trichloräthylen ausgefällt. Die Bildung der Schardingerdextrine wurde durch die Jodprobe von TILDEN und HUDSON (20) verfolgt. Die Rohdextrine wurden vielmals aus heissem Wasser umkristallisiert. Das relativ leichtlösliche α -Dextrin konnte vollständig entfernt und ein sehr schönes wohlkristallisiertes Präparat vom β -Dextrin gewonnen werden. $[\alpha]_D$ war $157,5^\circ$, in bester Übereinstimmung mit dem von FREUDENBERG angegebenen Wert.

Ein Versuch wurde gemacht, die Hydrolyse des ringförmig gebauten Dextrins durch Oxydation mit HJO_4 zu bestimmen. Die Schardingerdextrine verbrauchen (siehe weiter unten) bei der Oxydation mit Perjodat in schwefelsaurer Lösung genau 1 Atom Sauerstoff pro Glucoserest. Die aus dem ringförmigen Dextrin bei der Hydrolyse entstehenden, reduzierenden Saccharide verbrauchen dagegen bei der Oxydation in 5 % Schwefelsäure 5 Atome Sauerstoff pro Glucoserest (AHLBORG, 21). Aus dem Sauerstoffverbrauch nach verschiedenen Hydrolysezeiten muss also der Gehalt der Hydrolysate an unverändertem Ausgangsmaterial berechnet werden können. Versuche über die Oxydation der Schardingerdextrine durch HJO_4 haben ausserdem für die Frage der Konstitution der Dextrine eine Bedeutung.

Oxydation des β -Dextrins mit HJO_4

0,1035 g völlig wasserfreies β -Dextrin wurde in 10 ml Wasser gelöst und mit 10 ml 0,1 Mol KJO_4 in *n* Schwefelsäure versetzt. Nach verschiedenen Zeiten (Zimmertemperatur) wurde der Sauerstoffverbrauch nach üblichen Methoden titrimetrisch festgestellt: Tabelle 2.

Tabelle 2.

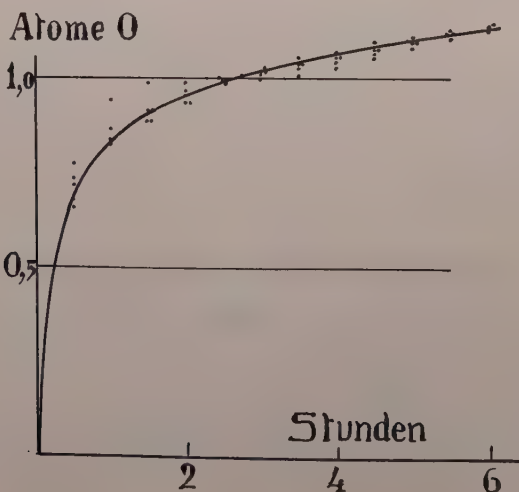
Zeit, Stunden	Atome O/Mol Glucose
1	0,118
3,75	0,404
22	0,808
28	0,889
76	0,994

Es wird also genau ein Atom Sauerstoff pro Glucoserest verbraucht. Dies ist mit der Annahme völlig in Übereinstimmung, dass alle Glucosereste in den 1- und 4-Stellungen glucosidisch verknüpft sind. Die Kohlenstoffkette der Glucosereste wird zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 gesprengt.

In den folgenden Oxydationsversuchen wurden die Reaktionsmischungen, die pro ml etwa 5 mg Dextrin enthielten, in geschlossenen Gefäßen im Thermostaten bei 50° gehalten. Nach verschiedenen Zeiten wurde der Sauerstoffverbrauch festgestellt. Die Versuche wurden teils in 0,1 n Schwefelsäure teils in Pufferlösung bei pH = 3,5 ausgeführt: Tabelle 3.

Tabelle 3.

Zeit, Stunden	Atome Sauerstoff pro Mol Glucose				
	in 0,1 n H ₂ SO ₄			bei pH = 3,5	
0,5	0,719	0,656	0,774	0,673	0,733
1,0	0,840	0,824	0,864	0,839	0,942
1,5	0,919	0,888	0,918	0,888	0,991
2,0	0,953	0,933	0,966	0,935	0,992
2,5	—	0,994	0,989	0,997	1,005
2,75	—	—	1,010	—	—
3,0	1,001	1,011	1,018	1,021	1,031
3,5	1,009	1,031	1,040	1,058	1,041
4,0	1,029	1,044	1,055	1,071	1,058
4,5	1,053	1,062	1,073	1,078	1,100
5,0	1,081	1,095	1,097	1,103	1,113
5,5	—	1,132	1,104	1,123	1,123
6,0	—	1,140	1,122	1,146	—
20	1,425	—	—	1,657	—
23	—	—	1,682	—	—
24	—	1,689	1,693	—	1,685
30	1,714	—	—	—	—



Die Versuche, die in der Abbildung 2 veranschaulicht sind, zeigen, dass bei 50° nach einer raschen Phase, während welcher offenbar die oben erwähnte Sprengung der Kohlenstoffketten der Glucosereste stattfindet, eine weitere sehr langsame Phase des Sauerstoffverbrauches folgt. Dies ist mit den erwähnten Ergebnissen AHLBORGS in völliger Übereinstimmung. Aus der Abbildung geht aber sehr deutlich hervor, dass in der Hauptreaktion ein Atom Sauerstoff pro Glucoserest verbraucht wird, was also mit der Annahme im Einklang ist, dass das β -Dextrin ringförmig gebaut ist. Stellte man sich z. B. vor, dass das β -Dextrin (angenommen es enthält sechs Glucosereste pro Molekül) aus einem Fünfring mit einem seitlichen Glucose-rest in 6-Stellung bestände, so müsste der Sauerstoffverbrauch pro Glucoserest 7/6 Atome sein. (Wenn aber ein seitlicher Glucoserest die Stellung 2 oder 3 haben sollte, was allerdings wenig wahrscheinlich erscheint, so würde der Sauerstoffverbrauch wieder ein Atom O/Glucoserest betragen.) Über die Anzahl der Glucosereste im Molekül sagen die Versuche selbstverständlich nichts aus.

LINDSTEDT (22) hat gezeigt, dass bei der Oxydation von höheren Sacchariden mit Perjodat in Phosphatpuffer bei pH = 7 ein sehr weitgehender Zerfall eintritt, wobei grosse Mengen von Kohlensäure entstehen. Dies ist auch bei der Oxydation des β -Dextrins der Fall wie aus der Tabelle 4 hervorgeht.

Tabelle 4.

Zeit, Stunden	Atome O/Mol Glucose
0,5	10,36
1,0	10,62
3,0	11,09
5,0	11,26
26	11,72
50	12,02

Saure Hydrolyse des β -Dextrins

Eingehende Untersuchungen der Hydrolyse in 51 % Schwefelsäure hat wie erwähnt FREUDENBERG ausgeführt. Besonders wurde dabei die Änderung der optischen Drehung untersucht. Die Drehung steigt zunächst, erreicht ein Maximum und fällt dann allmählich auf den Wert der Glucose ab. Der anfängliche Drehungsanstieg hängt offenbar damit zusammen, dass ein Penta- oder Hexasaccharid mit offener Kette eine höhere spezifische Drehung hat als das entsprechende ringförmige Saccharid. Die durchschnittliche Hydrolysegeschwindigkeit der Schardinger-dextrine war unbedeutend grösser als die der Stärke.

Wie schon erwähnt haben neulich SWANSON und CORI weitere Versuche über die saure Hydrolyse der Schardingerdextrine ausgeführt. Dabei wurde nicht nur der mittlere Hydrolysegrad durch Bestimmung der Reduktion ermittelt, sondern die Geschwindigkeit der Ringaufspaltung wurde durch ein besonderes Verfahren ermittelt. Die Konzentration des Ausgangsmaterials (Schardingerdextrins) nahm im Vergleich zum Anstieg des mittleren Hydrolysegrades schneller ab. Durch eine etwas umständliche Berechnung kommen die Autoren zum Ergebnis, dass eine *einzelne* Glycosidbindung im ringförmigen Dextrin bedeutend langsamer gespalten wird

als eine Bindung in einem Saccharid mit offener Kette. Dies zeigt ja ohne weiteres, dass die in derselben Arbeit von SWANSON und CORI gemachte Annahme, dass die Hydrolysegeschwindigkeit einer Glucosidbindung von der Lage derselben unabhängig ist, nicht zutreffen kann. Wie schon erwähnt, wird ja schon bei Sacchariden mit offener Kette die Hydrolysegeschwindigkeit einer Glucosidbindung von der Lage derselben im Molekül beeinflusst. Bei der Hydrolyse der Schardingerdextrine können sich selbstverständlich die Verhältnisse ausserdem noch dadurch komplizieren, dass die Hydrolysegeschwindigkeit einer Maltosebindung im Ring eine andere ist als in den Sacchariden mit offener Kette.

Wir wollen im folgenden zunächst den einfachsten Fall betrachten, nämlich dass sowohl in den ringförmigen Dextrinen wie in den Sacchariden mit offenen Ketten alle Bindungen mit einer und derselben Geschwindigkeitskonstante k gespalten werden. Wenn wir damit rechnen, dass das ringförmige β -Dextrin sechs Glucosereste pro Molekül enthält, so entsteht bei der sauren Hydrolyse zunächst durch Ringsprengung ein Hexasaccharid mit offener Kette („Maltohexaose“) und daraus allmählich Saccharide mit kürzeren Ketten (Penta- und Tetrasaccharid, Maltotriose, Maltose und Glucose). Wir werden für die *Konzentrationen* dieser Stoffe die folgenden Bezeichnungen wählen:

Ringförmiges Dextrin: c_{nR}

Saccharide mit offenen Ketten: mit n Gliedern: c_n

(Das β -Dextrin mit sechs Glucoseresten wird also mit c_{6R} , die Glucose mit c_1 , die Maltose mit c_2 usw. bezeichnet.)

Die *Mengen* der verschiedenen infragekommenden Produkte drückt man zweckmässig durch die Anzahl der darin eingehenden Glucosereste aus, also $6 c_{6R}$, $6 c_6$, $5 c_5 \dots 2 c_2$, c_1 . Die prozentischen Ausbeuten werden dann sehr einfach berechnet; sie ist z. B. für die Maltotriose $100 \cdot 3 c_3 / 6$, wenn wir die ursprüngliche Konzentration des β -Dextrins gleich 1 setzen.

Wenn wir nun vereinfachend annehmen, dass die Hydrolysekonstanten sämtlicher Bindungen gleich sind ($= k$), so erhalten wir für die Konzentrationen der infragekommenden Produkte nach der Zeit t Werte, die aus den folgenden Differentialgleichungen berechnet werden können:

$$\frac{dc_{6R}}{dt} = -6k c_{6R}$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 6k c_{6R} - 5k c_6$$

$$\frac{dc_5}{dt} = 2k c_6 - 4k c_5$$

$$\frac{dc_4}{dt} = 2k (c_6 + c_5) - 3k c_4$$

$$\frac{dc_3}{dt} = 2k (c_6 + c_5 + c_4) - 2k c_3$$

$$\frac{dc_2}{dt} = 2k(c_6 + c_5 + c_4 + c_3) - kc_2$$

$$\frac{dc_1}{dt} = 2k(c_6 + c_5 + c_4 + c_3 + c_2)$$

Die Integration dieser Gleichungen ergibt die folgenden Werte, wobei der Einfachheit halber $e^{-kt} = x$ gesetzt wird:

$$c_{6R} = x^6$$

$$c_6 = 6x^5(1-x)$$

$$c_5 = 6x^4(1-x)^2$$

$$c_4 = 6x^3(1-x)^2$$

$$c_3 = 6x^2(1-x)^2$$

$$c_2 = 6x(1-x)^2$$

Aus diesen Gleichungen berechnet man leicht die Ausbeuten an den verschiedenen Hydrolyseprodukten. So ist beispielsweise die Ausbeute an Tetrasaccharid

$$\frac{100 \cdot 6x^3(1-x)^2 \cdot 4}{6} = 400x^3(1-x)^2$$

Der *Hydrolysegrad* α zur Zeit t ist offenbar gleich der Anzahl der Moleküle mit offenen Ketten, durch die ursprüngliche Anzahl der Glucosidbindungen dividiert, also:

$$\alpha = \frac{6x^5(1-x) + 6(1-x)^2(1+x+x^2+x^3+x^4)}{6} = 1-x = 1-e^{-kt}$$

Die Tabelle 5 zeigt die prozentischen Ausbeuten an den verschiedenen Hydrolyseprodukten, für einige Werte von α berechnet.

Tabelle 5.

α	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
$6c_{6R}$	73,51	53,14	26,21	11,76	4,67	1,56	0,41	0,07	0,01	0,00
$6c_6$	23,21	35,43	39,32	30,25	18,66	9,37	3,68	1,02	0,15	0,01
$5c_5$	1,02	3,28	8,19	10,80	10,37	7,81	4,61	1,98	0,51	0,04
$4c_4$	0,86	2,92	8,19	12,36	13,82	12,50	9,22	5,29	2,05	0,32
$3c_3$	0,68	2,43	7,68	13,23	17,28	18,75	17,28	13,23	7,68	2,43
$2c_2$	0,47	1,80	6,40	12,60	19,20	25,00	28,80	29,40	25,60	16,20
c_1	0,25	1,00	4,00	9,00	16,00	25,00	36,00	49,00	64,00	81,00

Man ersieht aus der Tabelle, dass anfangs verhältnismässig sehr grosse Mengen vom Hexasaccharid entstehen. Die maximale Ausbeute sollte man bei einem Spaltungsgrad finden, der durch die Gleichung

$$\frac{d \, 6 \, c_6}{dx} = 0$$

gegeben ist. Setzt man $c_6 = 6 x^5 (1 - x)$ ein, so erhält man $x = 5/6$. Die maximale Ausbeute an Hexasaccharid sollte man also bei einem Spaltungsgrade $\alpha = 1/6$ finden. Dann ist $c_{6R} = \left(\frac{5}{6}\right)^6 = 0,3349$ und $c_6 = \left(\frac{5}{6}\right)^5 = 0,4019$. Nimmt man also an, dass die Hydrolyse der Schardingerdextrine nach dem hier besprochenen Schema verläuft (was ja bestimmt eine Vereinfachung der wirklichen Verhältnisse bedeutet), so kann maximal eine Ausbeute von 40,19 % Hexasaccharid erhalten werden. Die Ausbeute an Glucose ist gleichzeitig 2,78 %, die Ausbeute an Maltose + Maltotriose (d. h. sonst vergärbaren Stoffen) ist 10,62 %.

Die entstehende Glucose kann durch Gärversuche leicht und verhältnismässig genau bestimmt werden, ebenso die Summe der sonst vergärbaren Zucker (Maltose + Maltotriose). Die Einzelbestimmung dieser Zucker durch Gärungsversuche ist dagegen weniger genau. Von einem gewissen Interesse ist der Spaltungsgrad, bei dem die Summe von Maltose und Maltotriose ihr Maximum hat. In diesem Falle ist

$$\frac{d(2c_2 + 3c_3)}{dx} = 0. \text{ Man findet } x = \sqrt[3]{\frac{1}{6}} = 0,4082 \text{ und } \alpha = 0,5918.$$

In einigen Hydrolyseversuchen mit Schwefelsäure wurde jetzt untersucht, inwieweit der gefundene Reaktionsverlauf mit dem berechneten übereinstimmt:

Versuch 1. 1,467 g trockenes β -Dextrin wurden in 500 ml siedend heisse 0,5 n Schwefelsäure aufgelöst und unter Rückfluss in siedendem Wasserbade gehalten. Nach verschiedenen Zeiten wurden je 20 ml herausgenommen, schnell neutralisiert und abgekühlt. Die Reduktion wurde nach BERTRAND bestimmt und als Glucose berechnet. Aus den gefundenen Werten wurde der Hydrolysegrad α ermittelt, was nach dem Obigen nur approximativ richtig sein kann: Tabelle 6.

Tabelle 6.

Zeit, Min.	Spaltungsgrad % (= % »Glucose«)	$k = \frac{1}{t} \log \frac{\alpha}{\alpha - x}$
15	5,05	0,00153
30	16,1	253
45	27,2	306
60	42,0	395
75	48,0	379
90	55,0	386
105	64,0	423
120	67,5	407
140	73,0	407
150	74,5	396
180	80,0	388
210	86,0	406
255	89,0	376
285	95,0	456
315	95,5	428
330	96,6	444

Die nach der monomolekularen Formel berechneten Koeffizienten steigen anfangs stark an, bleiben aber nachher ziemlich konstant. Da im Anfang der Reaktion die Konstante der Ringsprengung geschwindigkeitsbestimmend sein muss, so bedeutet dies, dass die Bindungen im ringförmigen Dextrin langsamer gespalten werden als die der Saccharide mit offenen Ketten. Eine gewisse Rolle spielt selbstverständlich auch der Umstand, dass terminale Bindungen bestimmt schneller gespalten werden als die übrigen Bindungen der Saccharide mit offenen Ketten.

Da die Bestimmung des Hydrolysegrades nach der Bertrandschen Methode eigentlich nichts über die Hydrolysegeschwindigkeit der einzelnen Bindungen aussagt, so wurde versucht, die Hydrolyse mit Hilfe einer ganz anderen Methode zu verfolgen. Wie oben gezeigt, verbraucht das β -Dextrin bei der Oxydation mit Perjodat genau 1 Atom Sauerstoff pro Glucoserest. Die freie Glucose und sämtliche reduzierende Saccharide der Maltosereihe verbrauchen dagegen 5 Sauerstoffatome pro Glucoserest. Wenn daher nach einer gewissen Hydrolysezeit t das ringförmige Dextrin zu y Prozent aufgespalten ist, so entspricht dies einer Steigerung des Sauerstoffverbrauches bei der Perjodatoxydation von 1 Atom Sauerstoff pro Glucoserest auf den Wert $\frac{100 + 4y}{100}$ Atome. Wenn z. B. das Hydrolysat 2 Atome Sauerstoff pro Glucoserest verbraucht, so ist der Ring zu 25 % aufgespalten.

Versuch 2. 4,20 g β -Dextrin wurden in 500 ml 0,5 n Schwefelsäure im siedenden Wasserbade hydrolysiert. Herausgenommene Proben wurden dann in 0,1 n Schwefelsäure mit Perjodat oxydiert (50°). Die Tabelle 7 zeigt das Ergebnis.

Tabelle 7.

Zeit der Einwirkung von HJO_4	Sauerstoffverbrauch pro Mol Glucose nach einer Hydrolysenzeit von			
	30 Min.	75 Min.	180 Min.	255 Min.
0,5	1,86	3,77	4,84	4,94
1,0	2,24	4,06	4,88	—
1,5	2,48	4,33	4,92	—
2,0	2,73	4,48	4,94	5,00
2,5	2,86	4,63	4,97	—
3,0	3,04	4,72	4,98	—
3,5	3,20	4,77	4,99	—
4,0	3,39	4,83	5,00	5,02
4,5	3,43	4,86	5,02	—
5,0	3,46	4,90	5,03	—
5,5	3,50	4,92	5,04	—
6,0	3,54	4,95	5,05	5,06
6,5	3,57	4,97	5,05	—
7,0	3,60	—	5,06	—
24,0	3,73	5,16	5,11	5,11
Atome O pro Mol Glucose	3,54	4,91	5,02	5,02
x	64 %	98 %	100 %	100 %

Diese Methode zur Bestimmung des Hydrolysegrades ist sehr umständlich, weil ja für die Bestimmung von y eine recht grosse Zahl von Oxydationsversuchen nötig ist. Sehr genau können die gefundenen y -Werte auch nicht sein, da der Sauerstoffverbrauch aus einer Kurve extrapoliert werden muss. Es geht aber schon aus dem angeführten Versuch hervor, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen fast alles β -Dextrin schon nach 75 Minuten verschwunden ist. Aus dem Wert $y = 64\%$ nach 30 Minuten berechnet man die Konstante k_r der Sprengung einer einzelnen Glucosidbindung im Ring nach der Formel

$$6 k_r = \frac{1}{30} \log \frac{100}{100 - 64}$$

Man findet $k_r =$ etwa 0,0025. Vergleicht man diesen Wert mit denen des letzten Stabes der Tabelle 6, so geht hervor, dass die Konstante der Ringsprengung wesentlich niedriger sein muss als die Konstanten der Hydrolyse der an sich gleichen Bindungen der Saccharide mit offenen Ketten. (Wenn das β -Dextrin aus der Lösung praktisch verschwunden ist, so beträgt der *durchschnittliche* Hydrolysegrad nach der Tabelle 6 nur etwa 50 %.)

Versuch 3. Eine Bestimmung der Geschwindigkeit der Ringsprengung versuchten wir auch in einer anderen Weise auszuführen. In einem Versuch wie der Versuch 2 wurden je 50 ml Hydrolysat herausgenommen, mit 4 ml starker Natronlauge neutralisiert und dann 24 Stunden mit Trichloräthylen geschüttelt. Nach weiter 24 Stunden im Eisschrank wurde kalt zentrifugiert. Die Niederschläge wurden mit je 50 ml kaltem, mit Trichloräthylen gesättigtem Wasser und dann mit Alkohol gewaschen. Nach Trocknen an der Luft wurden die Niederschläge in n Schwefelsäure gelöst und zur vollständigen Hydrolyse 7 Stunden unter Rückfluss im siedenden Wasserbade gehalten. In der nicht hydrolysierten Probe (Zeit = 0 in der Tabelle 8) wurden 87 % der Substanz wiedergefunden. Die Verluste beruhen auf der Löslichkeit der Trichloräthylenverbindung, unvollständiger Hydrolyse etc. Der Wert der 0-Probe wurde gleich 100 gesetzt und die entsprechenden Werte der Hydrolysate darauf bezogen. In der Tabelle 8 sind diese Werte angeführt sowie die daraus berechneten Werte der Hydrolysekonstante k_r einer Einzelbindung des β -Dextrins. Die Werte schwanken recht stark; sie zeigen aber, dass die Konstante k_r nur etwa halb so gross wie die Konstante k sein kann.

In den Zentrifugaten der Trichloräthylenverbindung wurde die Reduktion sowohl nach BERTRAND wie nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL bestimmt. Im letzteren Falle wurde der Reduktionswert der Proben wegen des Jodverbrauches der 0-Probe korrigiert. Die aus den Reduktionswerten berechneten Werte vom Hydrolysegrad α , die ja mit den an den Hydrolysaten direkt nach der Bertrand-Methode gemessenen (Stab 2 der Tabelle 8) identisch sein sollten, findet man in den Stäben 6 und 7. Im Stabe 8 sind die Mittel sämtlicher Bestimmungen von α angeführt und unter 9 die daraus berechnete mittlere Hydrolysekonstante k_m . Stab 4 enthält die gefundenen Mengen nicht umgewandelten Dextrins und Stab 5 die daraus berechnete Konstante k_r . Das Mittel von k_r ist 0,0017, das von $k_m = 0,0040$.

Versuch 4. In dieser Versuchsreihe wurden nicht nur Hydrolysegrad und Menge β -Dextrin sondern auch die Mengen der vergärbaren Hydrolyseprodukte bestimmt. β -Dextrin wurde in 0,5 n Schwefelsäure im Wasserbad hydrolysiert; Proben von je 50 ml wurden herausgenommen, schnell abgekühlt und mit BaCO_3 neutralisiert.

Tabelle 8.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Zeit der Hydrolyse Min.	α	k	Cyklo- amylose %	k_r	α Bertrand	α Willstätter	α Mittel	k_m
0			100,0					
10	5,9	0,0027	77,2	0,0018	7,8	8,6	7,2	0,0032
20	11,7	27	51,5	23	14,8	16,2	14,6	34
30	19,3	31	39,9	22	21,6	22,3	21,1	35
45	32,0	37	37,6	15	27,8	32,8	30,9	36
60	41,9	39	30,7	15	40,2	42,2	41,4	39
90	62,0	47	18,9	13	—	—	(62,0)	47
120	72,9	47	13,6	12	72,1	72,7	72,6	47
180	85,9	47	—	—	—	—	(85,9)	47
240	92,8	(0,0065)	—	—	—	—	—	—

Das Bariumsulfat wurde abfiltriert und gewaschen, Filtrat + Waschwasser auf 50 ml eingedampft. Dann wurde 48 Stunden mit Trichloräthylen auf der Maschine geschüttelt und dann weiter 8 Tage im Kühltank stehen gelassen. Die optische Drehung der Filtrate wurde in 1 dm Rohr bestimmt (Stab 2 der Tabelle 9), ebenso die Reduktion nach der Methode von WILLSTÄTTER und SCHUDEL. Die Reduktionswerte wurden in % Spaltung umgerechnet (Stab 4). Aliquote Teile der Filtrate wurden mit Schwefelsäure vollständig hydrolysiert. Die durch Reduktionsbestimmung ermittelte Glucosemenge ist offenbar gleich der Totalmenge der nicht ringförmigen Hydrolyseprodukte ($c_1 + \dots + c_6$). Die Werte sind wegen der Löslichkeit der Trichloräthylenverbindung korrigiert (Stab 6).

Die gärfähigen Zucker wurden mit Presshefe bestimmt. Wie früher beschrieben, lassen sich mit der hiesigen Presshefe Glucose und Maltose getrennt bestimmen. Ist aber Maltotriose anwesend, so vergärt diese mit einer Geschwindigkeit, die sich von der der Maltose so wenig unterscheidet, dass man nur die Summe von Maltose und Maltotriose bestimmen kann. Aus den Gärversuchen und aus Parallelversuchen mit bekannten Mengen von Glucose und Maltose werden die Mengen der vergärbaren Zucker in den Hydrolysaten bestimmt (Tabelle 9, Stab 8 und 9).

Die optische Drehung der von dem Rest des β -Dextrins befreiten Hydrolysate ist anfangs niedrig, steigt zu einem Maximum und fällt dann ab. Wenn man mit Hilfe der Zahlen des Stabes 6 der Tabelle 9 die spezifische Drehung der Hydrolysate bestimmt, so erhält man die Zahlen, die im Stab 3 der Tabelle angeführt sind. Die spezifische Drehung ist also anfangs etwa 163° und sinkt dann allmählich auf den Wert der Glucose, $+52,7^\circ$ ab. Die gefundenen Werte stimmen gut mit den von FREUDENBERG für die Saccharide der Maltosereihe berechneten überein.

Wie in den früheren Versuchen finden wir, dass die „Konstante“ k_m stark ansteigt. Die „Konstante“ k_r der Spaltung einer einzelnen Glykosidbindung im β -Dextrin ist dagegen fast konstant und zwar hat sie einen Wert, der 30—50 % von dem Wert der Konstante k_m beträgt. Dass k_r konstant sein sollte, ist ja unter allen Umständen zu erwarten, dagegen ist k_m offenbar dadurch beeinflusst, dass erstens die Bindungen des Ringes, zweitens wahrscheinlich auch die terminalen Bindungen der Saccharide mit offenen Ketten andere Hydrolysekonstanten haben als die anderen Bindungen.

Tabelle 9.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Zeit der Hydrolyse Min.	Drehung in 1 dm Rohr	$[\alpha]_D$	α (%)	k_m	$c_1 + c_2 + \dots + c_6$ (%)	k_r	Glucose %	Maltose + Maltotriose %
0	+0,08	—	0	—	0	—	0	0
15	0,30	+163°	3,6	0,0011	19,1	0,0010	(1,1)	0,3
30	0,43	153°	7,6	11	29,1	8	1,8	3,7
45	0,68	157°	15,4	16	44,9	9	7,3	9,0
60	0,74	134°	22,6	19	57,3	10	11,2	12,7
92	0,78	120°	35,5	21	67,2	9	27,6	18,6
123	0,73	102°	48,2	23	74,1	8	44,8	22,0
150	0,68	80°	58,0	25	87,7	10	55,3	20,5
210	0,55	62°	73,5	27	92,1	9	77,2	14,6

Wenn sämtliche Bindungen aller infragekommenden Saccharide die Hydrolysekonstante k haben, so ist wie oben gezeigt wurde, $\alpha = 1 - x = 1 - e^{-kt}$. Aus den oben gemessenen Werten von α können wir dann x berechnen und daraus nach den oben gegebenen Formeln die Mengen der verschiedenen Produkte in den Hydrolysaten. In der Tabelle 10 sind die so berechneten Werte von $6 c_{6R}$ (Cykloamylose), c_1 (Glucose) und $2 c_2 + 3 c_3$ (Maltose + Maltotriose) zusammengestellt.

Tabelle 10.

$\alpha = 1 - x$	$6 c_{6R}$ (%)		c_1 (%)		$2 c_2 + 3 c_3$ (%)	
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
0,036	80,3	80,9	0,0001	(0,01)	0,006	0,003
0,076	62,2	70,9	0,0005	0,018	0,026	0,037
0,154	36,7	55,1	0,024	0,073	0,091	0,090
0,226	21,5	42,7	0,051	0,112	0,171	0,127
0,355	7,2	32,8	0,126	0,276	0,320	0,186
0,482	1,9	25,9	0,232	0,448	0,428	0,220
0,580	—	12,3	0,336	0,553	0,461	0,205
0,735	—	7,9	0,540	0,772	0,400	0,146

Die Tabelle zeigt sehr deutlich, dass:

- 1) Die Menge der Cykloamylose viel langsamer abnimmt als berechnet und dass also die konstante k_r der Ringsprengung bedeutend kleiner als die Konstante k_m sein muss.
- 2) Dass die Menge der Glucose viel stärker zunimmt als berechnet und dass also die Spaltungsgeschwindigkeit wenigstens einer terminalen Bindung grösser sein muss als die der übrigen Bindungen der Saccharide mit offenen Ketten, was ja nach den Arbeiten von FREUDENBERG zu erwarten war,

- 3) dass die gefundenen Mengen der sonst vergärbaren Saccharide (Maltose und Maltotriose) kleiner sind als die berechneten, was selbstverständlich auch damit zusammenhängt, dass diese Saccharide relativ mehr terminale Bindungen enthalten als die höheren Saccharide und deshalb schneller gespalten werden als berechnet.

Da die Hydrolyse der Schardingerdextrine offenbar nicht nach der hier angewendeten einfachen Formel berechnet werden kann, soll in einer folgenden Arbeit untersucht werden, ob die Versuchsergebnisse mit Formeln vereinbar sind, die unter Annahme mehrerer Hydrolysekonstanten abgeleitet werden können.

LITERATUR. (1) **Freudenberg, K.**, *Angew. Chemie* 47, 675 (1934). — (2) **Freudenberg, K. und Jacobi, R.**, *Ann.* 518, 102 (1935). — (3) **Freudenberg, K., Blomqvist, G., Ewald, L. und Soff, K.**, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 69, 1258 (1936). — (4) **Freudenberg, K. und Rapp, W.**, *ibid.* 69, 2041 (1936). — (5) **Freudenberg, K. und Meyer-Delius, M.**, *ibid.* 71, 1596 (1938). — (6) **Freudenberg, K. und Boppel, H.**, *ibid.* 73, 609 (1940). — (7) **Doudoroff, M., Barker, H. A. and Hassid, W. Z.**, *J. biol. chem.* 168, 725 und 733 (1947). — (8) **Doudoroff, M., Hassid, W. Z. and Barker, H. A.**, *ibid.* 170, 147 (1947). — (9) Zusammenfassung in **Kerr, R. W.**, *Chemistry and Industry of Starch*, Acad. Press Inc. New York, N. Y. (1944). — (10) **Myrbäck, K. und Gjörling, L. G.**, *Arkiv kemi, mineral. geol.* 20 A, Nr 5 (1945). — (11) **Myrbäck, K.**, *Advances in Carbohydrate Chemistry* 3, 251 (1948). — (12) **Myrbäck, K. und Johansson, N. O.**, *Arkiv kemi, mineral. geol.*, 20 A, Nr 6 (1945). — (13) **Kratky, O. und Schneidmesser, B.**, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 71, 1413 (1938). — (14) **French, D. and Rundle, R. E.**, *J. am. chem. soc.* 64, 1651 (1942). — (15) **Freudenberg, K., Plankenhorn, E. und Knauber, H.**, *Ann.* 558, 1 (1947). — (16) **Swanson, M. and Cori, C. F.**, *J. biol. chem.* 172, 797 (1948). — (17) **Myrbäck, K.**, *Svensk kem. tid.* 53, 67 (1941); 53, 264 (1941). — (18) **Freudenberg, K. und Blomqvist, G.**, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 68, 2070 (1935). — (19) **Myrbäck, K., Örtenblad, B. und Ahlborg, K.**, *Biochem. Z.*, 307, 53 (1940). — (20) **Tilden, C. B. und Hudson, C. S.**, *J. am. chem. soc.* 61, 2900 (1939). — (21) **Ahlborg, K.**, *Svensk kem. tid.* 54, 205 (1942). — (22) **Lindstedt, G.**, *Arkiv kemi, mineral. geol.* 20 A, Nr 13 (1945); *Nature* 156, 448 (1945).

Tryckt den 29 april 1949

Acide pyruvique et réticulocytes dans le sang des rats normaux et cancéreux

Par NORA BARGONI¹

Il y a environ dix ans que l'on a découvert (1) que le serum des rats sarcomateux contient une quantité d'acide pyruvique (AP.), dépassant celle du serum des rats normaux dans la proportion de 1 à 2—4. Cette constatation a été confirmée par de nombreuses recherches postérieures et non seulement pour les rats porteurs du sarcome de JENSEN (2), mais aussi pour les rats présentant des tumeurs directement provoquées par le benzopyrène ou le méthylcholanthrène, ou venant de tumeurs d'origine chimique; pour les lapins porteurs du carcinome de Brown-Pearce; pour les souris présentant un carcinome de EHRLICH; pour la race de souris présentant une tumeur à type lymphosarcome, sélectionnée par C. KREBS à Aarhus, et enfin pour les souris présentant un ascites-carcinome, étudiés par H. W. SCHMIDT (3).

On ne voit pas clairement l'effet des formations cancéreuses sur la concentration de l'AP du sang de l'animal, si la tumeur n'a pas dépassé 3 % environ du poids total de l'organisme porteur de la tumeur. En accord avec cette observation, dans plusieurs cas de cancer humain déjà avancé, qui présentaient des métastases, l'augmentation de la quantité d'acide pyruvique du sang, qui fut observée (4), était très petite ou nulle.

La teneur en acide pyruvique du sang normal résulte des composants du système métabolique de cet acide, c'est à dire de beaucoup de facteurs. Elle est essentiellement influencée par les co-enzymes co-carboxylase et cozymase, co-enzymes qui déterminent l'équilibre entre les acides pyruvique et lactique, et les composants du cycle de respiration: acide citrique et succinique (SZENT GYÖRGYI, KNOOP et MARTIUS; F. LIPMANN).

La teneur en acide pyruvique du sang normal est en outre plus ou moins influencée par l'âge et le sexe des animaux, par le cycle sexuel (5) et la gravidité des femelles (6), par les hormones insuline, adrénaline (7), folliculine, testostérone, prolane (8), et par des vitamines.

Comme valeur moyenne, obtenue par environ 200 déterminations (sans tenir compte de l'âge, du sexe etc.) VON EULER et ses collaborateurs donnèrent celle de 13 γ d'acide pyruvique pour 1 ml du sang.

Pour les rats porteurs d'un sarcome de Jensen a été constatée (2) la corrélation suivante entre le poids de la tumeur et la quantité d'acide pyruvique dans le sang:

¹ Bourse d'étude A. A. U. W. Crusade International de la «International Federation of University Women».

Poids de la tumeur	γ AP/ml. du sang
jusqu'à 10 g	28,5
10—20 »	35,0
20—30 »	39,8
30—60 »	57,2

On a en outre observé que les régressions des sarcomes qui se produisent sous l'influence de certaines hormones ou de substances extractives, sont accompagnées d'une diminution de la concentration de l'acide pyruvique. Assez souvent cette diminution d'AP indique la régression cancéreuse même.

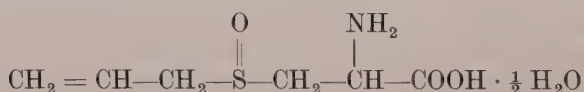
A cet égard on s'est occupé pendant un certain temps, dans cet Institut, de l'action remarquable des extraits d'*Allium sativum* (9).

De ce point de vue il nous sembla intéressant d'examiner le rôle de l'alliine, récemment isolée par A. STOLL (10) qui a réussi ensuite à établir sa constitution chimique.

Nous nous sommes proposé d'étudier l'influence d'injections d'alliine sur des rats normaux et sarcomateux. Dans ce but il fallait alors, établir la valeur moyenne d'acide pyruvique dans le sang, tant des rats normaux que des rats cancéreux, et comparer cette quantité avec celle qu'on pouvait déterminer après l'injection.

Recherches personnelles

L'alliine dérive d'un nouvel acide aminé, jusqu'ici inconnu, le l-(—)-S-allyl-cystéine. A l'alliine même STOLL a donné la formule



1. Méthode de détermination de la quantité d'acide pyruvique dans le sang

J'ai suivi la méthode de LU (11), modifiée par VON EULER, SCHLENK et HÖGBERG (12).

Le sang qu'on devait examiner — la quantité variant entre 0,1 et 0,6 ml — fut très rapidement déprotéinisé par l'acide trichloracétique, tout de suite après la décapitation des rats. L'acide pyruvique, présent dans le sang prélevé, fut transformé en son correspondant dinitrophenylhydrazone, qu'on extrayait ensuite de la solution aqueuse avec l'acétate d'éthyle. On éloignait l'excès de dinitrophenylhydrazine et après avoir adjoint une solution alcaline, on déterminait au «Stufenphotometer» la couleur rouge. La concentration de l'acide pyruvique fut déterminée avec l'aide d'une courbe, d'abord élaborée avec une solution standard d'acide pyruvique.

Dans les tableaux 1 et 2, qui résument les valeurs moyennes obtenues pendant le cours de mes recherches, voici les résultats auxquels je suis parvenue.

L'augmentation de la quantité de l'acide pyruvique dans le sang des rats normaux de 11,5 γ jusqu'à 21,9 γ (tab. 1) correspond à l'augmentation obtenue par une injection d'adrénaline (NYLIN, EULER, HÖGBERG (7)).

La diminution d'AP (tab. 2) correspond aux diminutions, souvent irrégulières, du poids des sarcomes, causées par des injections d'alliine, qui peuvent aller jusqu'à la totale disparition des sarcomes eux-mêmes.

Tab. 1.

Rats normaux.

(Poids moyen des animaux : 160 g.)

Quantité d'alliine injectée	Durée d'incubation	γ AP./ml. de sang
—	—	11,5
20 mg	5 h.	21,9

Tab. 2.

Rats cancéreux.

(Poids des animaux: 174 g. — Poids des benzopyrènesarcomes: 36 g.)

Quantité d'alliine injectée	Durée d'incubation	γ AP./ml. de sang
—	—	42
20 mg	23 h.	34
20 + 20 mg	23 + 29 h.	21

Les recherches devant nous permettre une comparaison quantitative des résultats obtenus avec l'alliine, n'ont pas encore été publiées.

Les extraits du bulbe d'*Allium*, qui ont causé les diminutions mentionnées d'acide pyruvique dans le sang, ont été injectés dans des rats porteurs de sarcomes assez petits. Ils ont causé une diminution de la concentration d'acide pyruvique et une disparition totale du sarcome.¹

Quant à la nature du facteur des bulbes d'*Allium* dont on a observé ici l'activité, on ne peut encore rien dire.

Au cours de nombreuses recherches sur le rapport entre les tumeurs et la concentration de l'acide pyruvique dans le sang on s'est plusieurs fois demandé de quelle façon peut se réaliser cette extraordinaire activité. Certainement l'hypothèse la plus simple et la plus plausible serait d'admettre que le sarcome fournit au sang une substance capable, par son influence, de déterminer une plus forte concentration d'acide pyruvique dans le sang. Cependant la démonstration expérimentale d'une telle hypothèse n'a pas encore été donnée.

On se demande aussi pourquoi et comment une égale augmentation de l'acide pyruvique peut se produire chez les rats non sarcomateux de la même façon que chez les rats présentant des tumeurs, question que se posèrent RÖNNESTAM, VON EULER et HÖGBERG (14), quand ils observèrent que la quantité d'acide pyruvique augmentait fortement dans le sang des rats privés de la vitamine A.

On doit considérer à ce propos, que la carence de la vitamine A produit une diminution du volume du foie, dans lequel, comme on sait, la vitamine A est accumulée. Ensuite il faut encore se rappeler que l'on a mis en évidence, depuis longtemps, précisément dans le foie des animaux cancéreux, une particularité biochimique: une très grande diminution de la concentration de la catalase, c'est à dire de l'activité de la catalase, diminution d'abord démontrée par BRAHN (15), ROSENTHAL (16), COLWELL (17) et MAGAT (18), et plus récemment étudiée à fond par GREENSTEIN (19).

¹ Voir EULER et LINDEMAN, Arkiv f. kemi 1, nr 8 (1948/49).

Il n'est pas nécessaire d'introduire ici l'hypothèse d'une corrélation entre le potentiel d'oxydoréduction et la quantité d'acide pyruvique dans le sang. Mais on peut supposer que — selon une hypothèse émise d'abord par BURGE (20) et ensuite plusieurs fois soutenue — le foie est un des centres de la formation du sang.

Cette considération nous a porté à étudier — en relation aussi avec les recherches précédentes de cet Institut — si le nombre des réticulocytes, érythrocytes jeunes du sang, est influencé par la présence d'une tumeur, et de quelle façon cette influence se produit.

Mes recherches ont donné le résultat que le nombre des réticulocytes dans le sang des rats sarcomateux *ne représente que la moitié de celui qu'on trouve dans le sang des rats normaux*.

Le nombre de ces formes jeunes d'érythrocytes a été souvent étudié chez l'homme, au point de vue de l'importance clinique dans la formation du sang et surtout dans l'augmentation de ces réticulocytes.

SEYDERHELM (21) a observé que l'augmentation du nombre des réticulocytes n'est pas toujours accompagnée d'une augmentation des éléments figurés du sang, et qu'en tous cas, jamais elle n'est parallèle à celle-ci; il observa encore que souvent l'augmentation du nombre des réticulocytes provient des éléments jeunes, venus de la réserve de la moelle osseuses, provoquée peut-être, par l'action de l'acide ascorbique.

Mais même si on est arrivé, dans certains cas par une stimulation, chimique ou non, à provoquer une augmentation du nombre des réticulocytes sans modifier le nombre total des érythrocytes, on doit se rappeler qu'après la formation de substances hémopétiqques — par exemple le Fe et le As — une réticulocytose caractéristique suit de près les synthèses connexes à la formation de l'hémine. Et surtout il ne faut pas oublier les résultats des recherches conduites par MINOT et MURPHY (22), selon lesquelles dans l'hépatothérapie de l'anémie perniciouse, une réticulocytose devient évidente bien avant une augmentation des globules rouges du sang. De ce point de vue l'étude biochimique quantitative des substances qui déclenchent une forte augmentation des réticulocytes devient particulièrement intéressante.

Parmi les composants des aliments, l'acide ascorbique est, selon SEYDERHELM et GREBE (23), celui qui, en particulier, produit chez l'homme et dans les cobayes, donné par injection et per os, une remarquable réticulocytose.

Les recherches qui ont été faites dans cet Institut, ont démontré qu'on peut rendre plus évidente la forte augmentation qui suit l'introduction pérorale d'acide ascorbique, si on a d'abord provoqué, chez les animaux en observation, une anémie scorbutique. En administrant de l'acide ascorbique, les symptômes du scorbut disparaissent très vite et la valeur normale des réticulocytes peut augmenter jusqu'à 5—10 fois.

Parmi les résultats auxquels sont parvenus VON EULER et MALMBERG, je rappelle ici seulement l'influence de la carence de la vitamine A. La diminution des nombres des réticulocytes dans les rats privés de la vitamine A, est mise en évidence dans le tableau suivant, qui donne la valeur moyenne de 39 déterminations sur les rats.

Tab. 3.

Rats normaux		Rats privés de la vitamine A	
Érythrocytes millions/ml.	Réticulocytes %	Érythrocytes millions/ml.	Réticulocytes %
5,75	7,20	5,57	3,80

Le nombre des globules rouges n'est donc pas sensiblement modifié par la carence de la vitamine A: on peut seulement observer une petite augmentation de 15 % environ. Au contraire le nombre des réticulocytes est réduit à 1/2 de sa valeur normale.

Ensuite on a observé qu'en donnant aux rats précédemment privés de la vitamine A une nourriture contenant cette vitamine, ils présentaient en même temps une augmentation de poids et une augmentation très forte des réticulocytes. Après 2 ou 3 semaines ils en avaient retrouvé la valeur normale et souvent même ils l'avaient dépassée (25). Parmi les recherches qu'on a faites sur les cobayes, je veux seulement ici rappeler celles faites avec des extraits purifiés d'*Allium sativum* (Z. physiol. Chem. 256, pag. 249) dans lesquelles, avec une injection de 0,2 ml d'extrait, on obtenait une augmentation des réticulocytes de 2—3 % jusqu'à 24 %. J'ai rappelé ce fait à cause de sa connection avec mes recherches actuelles par l'emploi d'alliine.

2. Déterminations personnelles de la quantité d'érythrocytes et de réticulocytes dans le sang des rats

Méthode. Les érythrocytes prélevés à la queue des rats étaient comptés comme d'ordinaire dans un hématomètre, type Burkner. Pour la coloration et ensuite la détermination des réticulocytes, j'ai suivi la méthode de HOLBOLL, modifiée par HEILMEYER et très employée dans les recherches d'hématologie: 0,1 ml de sang (toujours prélevé à la queue) est mis dans une cuvette paraffinée avec 0,025 ml d'une solution 1 % de bleu-cresyl brillant en solution physiologique. On laisse le sang en contact avec le colorant pendant une demi-heure et après on l'étend sur un verre porte-objets. Après la fixation par l'alcool méthylique, on le colore avec du Giemsa dilué. On peut très bien reconnaître les réticulocytes au microscope, grâce aux granulations basophiles qu'elles contiennent.

Résultats. La première série de recherches a permis de donner une réponse à la question que nous nous sommes posée: le nombre des réticulocytes est-il influencé par la présence d'une tumeur. Les résultats sont resumés dans les tableaux 4 et 5:

Tab. 4.

Rats normaux.

Poids du rat g	Érythrocytes millions/ml.	Réticulocytes %
172	6,74	1,4
165	6,56	1,6
155	6,12	1,3

Comme on peut l'observer immédiatement le pourcentage des réticulocytes diminue déjà jusqu'à 1/3 ou 1/4 de sa valeur normale en présence d'un sarcome relativement petit. Les chiffres absolus des réticulocytes d'EULER et MALMBERG, obtenus chez une autre race de rats, sont beaucoup plus élevés que ceux, que l'ai trouvé; mais quant au rapport des valeurs obtenus pour les rats normaux et cancéreux, les résultats des deux recherches concordent.

Tab. 5.
Rats benzopyrènesarcomateux.

Poids du rat g	Poids du sarcome g	Érythrocytes millions/ml.	Réticulocytes %
246	12	5,80	0,4
215	2 9	6,30	0,3
230	3,5	6,38	0,4
183	6,0	6,09	0,7

Lors des recherches ultérieures, il faudra encore voir si chez les rats présentant des sarcomes plus grands le nombre des réticulocytes diminue davantage. On voit aussi très clairement que le nombre total des érythrocytes des rats sarcomateux est assez diminué mais je ne peux pas encore dire à quelle en est la cause. Il me semble ainsi démontré que le nombre des réticulocytes est modifié par la présence d'une tumeur, dans le même sens que dans le cas des rats privés de la vitamine A:

Chez les rats sarcomateux et chez les rats privés de la vitamine A j'ai pu constater une diminution des réticulocytes de 1/3 jusqu'à 1/5 de leur valeur normale.

Dans le foie des rats sarcomateux, la quantité de la catalase est fortement diminuée, comme le démontrent les recherches de BRAHN, GREENSTEIN et d'autres.

On est ainsi amené à déduire qu'en raison des deux influences précitées, la croissance des animaux traités permet de conclure que la diminution du potentiel d'oxydation est la cause primaire commune de l'effet observé.

Le fait que la quantité d'acide pyruvique dans le sang augmente fortement sous l'influence des tumeurs et sous l'influence de la carence de la vitamine A confirme cette hypothèse.

Dans un plus grand nombre de recherches d'orientation, j'ai étudié les effets possibles obtenus sur le nombre des réticulocytes avec injection de différentes substances chez les rats et chez les cobayes. N'ayant pas encore fini mes recherches, je me limiterai à mentionner les résultats obtenus par des injections d'uréthane.

Comme on sait, l'uréthane s'est avérée, grâce aux recherches de HADDOW (26), DUSTIN (27), et autres, un remède pour la lutte contre la leucémie ainsi qu'un intéressant antibiotique chimique (28) produisant des effets sélectifs antimittotiques (29).

Tab. 6.
Rats normaux.

Poids des rats g	Uréthane inj. mg	Durée d'incubation heures	Érythrocytes millions/ml	Réticulocytes %
150	2	19	6,89	1,0
146	4	20	7,57	0,9
183	20	24	7,14	0,7

RÉSUMÉ

1) En confirmation de précédentes recherches on a constaté que la quantité de l'acide pyruvique dans le sang des rats cancéreux est plus forte (30-40 γ /ml de sang) que dans le sang des rats normaux (13 γ /ml de sang).

2) Par des injections d'alliine, isolée de l'*Allium sativum*, on obtient chez les rats normaux une forte augmentation de la quantité de l'acide pyruvique dans le sang.

Chez les rats sarcomateux on observe, après l'injection de 20 mg d'alliine, une diminution de la quantité de l'acide pyruvique du sang et du poids des sarcomes. Ces résultats correspondent à ce qu'on avait observé auparavant avec des extraits d'*Allium sativum*.

3) Les résultats qu'on peut tirer du présent travail permettent d'établir les rapports suivants:

	Quantité d'AP du sang	Nombre des réticulocytes	Quantité de la catalase du foie
Carence de Vitamine A	Augmentation	Diminution	—
Présence de sarcomes	Augmentation	Diminution	Diminution

Stockholm, Université, Institut de recherches en chimie organique.

BIBLIOGRAPHIE. (1) Euler et B. Höggberg, Sv. Vet. Akad. Ark. f. Kemi 13 B, No 16 (1939). — (2) von Euler, L. Ahlström, I. Rönnestam et I. Pettersson, Z. f. Krebsforsch. 55, 15 (1944). — (3) H. W. Schmidt, Z. f. Krebsforsch. 54, 170 (1943). — (4) A. Szent Györgyi, Studies on Biological Oxydations, Leipzig 1937. — (5) Euler, Euler et I. Pettersson, Naturwissen. 29, 63 (1941). — (6) Euler, I. Rönnestam-Säberg et B. von Euler, Z. physiol. Chem. 270, 125 (1941). — (7) G. Nylin, Euler, B. Höggberg, Klin. Wochenschr. 19, 433, (1940). — (8) Euler, Rönnestam-Säberg et Höggberg, Z. physiol. Chem. 268, 171 (1941). — (9) Résultats non publiés. — (10) A. Stoll et E. Sceebeck, Helv. Chim. Acta 31, 189 (1948). — (11) Lu, Biochem. J. 33, 249 (1939). — (12) Euler, Schlenk et Höggberg, Upsala Läkareför. Förh. n. F. 14, 301, 1939. — (13) S. Moeschlin, Exper. 3, 195 (1947). — (14) Euler, Rönnestam-Säberg et Höggberg, Z. physiol. Chem. 268, 235 (1941). — (15) Brahn, Sitz. Ber. Preuss. Akad. Wiss. 1919, 680 — 1916, 478. — (16) Rosenthal, Dtsch. Med. Wochenschr. 38, 2270 (1912). — (17) A. Colwell, Arch. Middlesex Hosp. 19, 64 (1940). — (18) J. Magat, Z. f. d. ges. exp. Med. 42, 95 (1924). — (19) J. P. Greenstein, Jenrette, W. V. et White, J. Biol. Chem. 141, 124 (1945). — (20) W. E. Burge, Am. Journ. Physiol. 44, 290 (1917). — (21) Seyderhelm et Tammann, Z. exp. Med. 57, 641 (1930) — 66, 557, 1932. Seyderhelm, Dtsch. med. Wochenschr. 1931. — (22) Minot et Murphy, Am. Journ. med. science 1923, 581. — (23) Voir aussi M. Stepp, Heilwirkung des Vitamins C. Umschau 39, 241, 1935. — (24) Euler et M. Malmberg, Z. physiol. Chem. 243, 121 (1936) — 249, 85 (1937) — 252, 24 (1937/38) — 256, 243 (1938) — 261, 103 (1939). — (25) —, Naturwiss. 27, 166 (1939). — (26) Haddow et Sexton, Nature 157, 500 (1946). — Lancet 1946, 677. J. Am. Med. Ass. 135, 901 (1947). — (27) P. Dustin, Nature 159, 794 (1947). — (28) Foà et Sepilli, Rev. Brasil. Biol. 6, 1946, 159. — (29) J. B. Murphy u. E. Sturm, Cancer Res. 7, 417 (1947).

Tryckt den 27 april 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Optically active higher aliphatic compounds. IV

The degradation of D(+)-3-methylheptacosanoic acid to D(—)-2-methylhexacosanoic acid¹

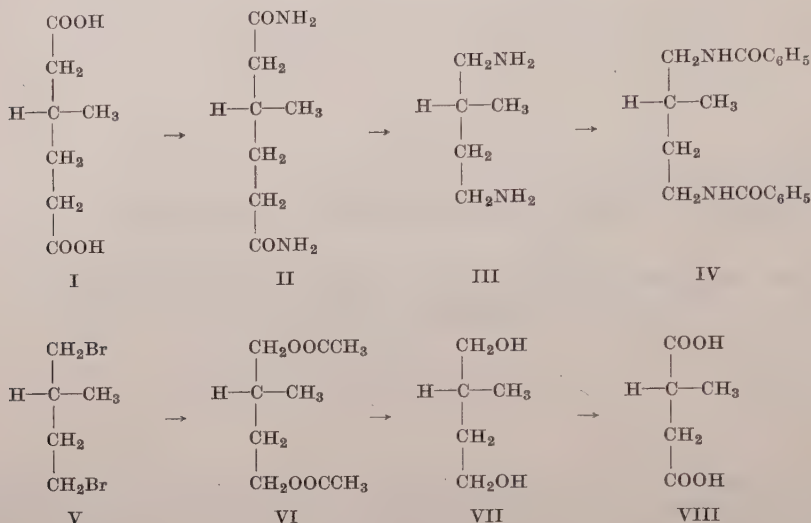
By STINA STÄLLBERG-STENHAGEN

The synthesis of dextrorotatory α -methyl substituted acids by lengthening the chain of L(+)-methylallylacetic acid was described in Part I (1). The synthesis of the laevorotatory enantiomorphs along the same route has so far not been possible, as the attempts to prepare D(—)-methylallylacetic acid in the optically pure state by resolution of the DL-acid by means of the common alkaloids have been unsuccessful. The method described in Part II (2) make the active enantiomorphs of long chain β -methyl substituted acids fairly easily accessible, and the preparation of laevorotatory α -methyl substituted acids by degradation of the sterically related dextrorotatory β -methyl substituted acids suggested itself. v. BRAUN and JOSTES (3, 4) have previously carried out a degradation of this type, *viz.* the bis-degradation of (—)- β -methyladipic acid to (—)-methylsuccinic acid. They used the series of reactions shown below.

(+)- β -Methyladipic acid (I) was converted into the diamide (II), and the latter subjected to the HOFMANN degradation, giving (+)- β -methyltetramethylenediamine (III). Distillation of the benzoyl derivative (IV) of the diamine with phosphorus tribromide gave (+)-2-methyl-1, 4-dibromobutane (V). The dibromide (V) was converted into the acetate (VI) of the corresponding glycol (VII), and the ester hydrolyzed. Oxidation of the dextrorotatory glycol (VII) finally gave (+)-methylsuccinic acid (VIII). The dextrorotatory methylsuccinic acid obtained had properties identical with those of (+)-methylsuccinic acid obtained by resolution of the DL-acid (6), indicating that racemization did not occur in any of the steps I–VIII. v. BRAUN and JOSTES also resynthesized (I) from (V) via nitrile synthesis. The dextrorotatory β -methyladipic obtained in this way showed properties identical with those of the initial material.

The degradation outlined above involves a great many steps, and it might be expected that the steps (I–V) leading to the bromide would give a comparatively low overall yield when applied to a long chain acid. A considerable simplification appeared possible, however, by proceeding directly from the β -methyl substituted acid to the bromide by degrading the silver salt of the acid by means of bromine according to the method of HUNSDIECKER and HUNSDIECKER (7). A preliminary experiment

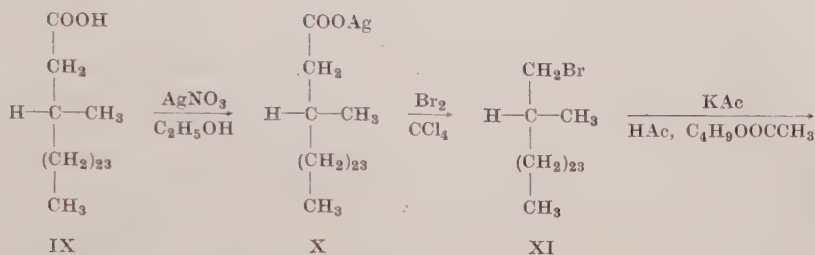
¹ In view of recent recommendations (5) small capital letters D and L will from now on be used instead of *d* and *l* to indicate the configuration of the asymmetric centre.



showed that the degradation of DL-3-methyltetracosanoic acid (Part II (2)) to DL-2-methyltricosanoic acid, m. p. 68.0–68.4°, could be performed in the manner indicated. The degradation of D(+)-3-methylheptacosanoic acid (IX) to D(–)-2-methylhexacosanoic acid (XIV) was subsequently undertaken. PRICE (8) has suggested that the degradation proceeds via a free radical mechanism, and ARNOLD and MORGAN (9) have recently shown that in accordance with this mechanism the degradation of optically active α -methyl substituted acids gives racemic secondary bromides. The degradation of an active β -methyl substituted acid, on the other hand, should be expected to proceed without racemization to an active 1-bromo-2-methyl substituted compound, and no indication of racemization has been found in the experiments to be described.

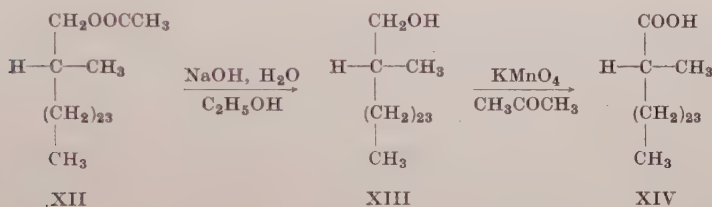
D(+)-3-Methylheptacosanoic acid (IX), m. p. 72.8–73.1°, $[\text{M}]_D^{21} + 13.5^\circ$, was prepared by CLEMMENSEN reduction of D(–)-3-methyl-5-ketoheptacosanoic acid, m. p. 77.7–77.9°, $[\text{M}]_D^{21} - 4.7^\circ$. The keto-acid was prepared by the method described in Part II (2) from D-methyl 3-keto-5-methyl pimelate and *n*-heneicosyl iodide. Degradation of the silver salt of D(+)-3-methylheptacosanoic acid by means of bromine in carbon tetrachloride solution gave D(+)-1-bromo-2-methylhexacosane (XI), m. p. 45.8–46.3°, $[\text{M}]_D^{21} + 2.7^\circ$. The yield was 65 % of the theoretical, calculated on the acid (IX). The bromide (XI) was converted into the acetate by refluxing with potassium acetate in glacial acetic acid-butyl acetate solution. The replacement of bromine takes place slowly, and the refluxing had to be continued for several days. The acetate (XII) was hydrolyzed to the alcohol (XIII). No purification of this intermediate was attempted, but in order to remove any unsaturated hydrocarbon that might be present a hydrogenation was performed before the oxidation was carried out. Oxidation of (XIII) was carried out with potassium permanganate in acetone solution at room temperature. The oxidation proceeded slowly, but was complete in about 4 days. After purification via the barium salt pure D(–)-2-methylhexacosanoic acid (XIV) was obtained in a yield of 45 %, calculated on the bromide (XI). The overall yield, calculated on the β -methyl substituted acid (IX), was 29 % of the theoretical. The

Chart.



D(+)-3-methylheptacosanoic acid

D(+)-1-bromo-2-methylhexacosane



D(-)-2-methylhexacosanoic acid

acid showed within the experimental error an optical rotation numerically equal to that of the antipode described in Part I (1), *viz.* $[\text{M}]_D^{21} - 28^\circ$.

As described in detail in the experimental part, the laevorotatory acid showed a complex polymorphic behaviour, with a vitreous form melting at $68-68.5^\circ$, and two crystalline forms melting at 70.2° and 74° respectively. The dextrorotatory enantiomorph was reported in Part I (1) to melt at $69.6-69.9^\circ$, and polymorphism had not been observed in acid crystallized from light petroleum or from benzene. The long X-ray spacing was $49.5 \text{ \AA}$, which is the same as that now found for the modification of the antipode melting at 70.2° .

The behaviour of the dextrorotatory enantiomorph was therefore reinvestigated. Recrystallization of the earlier sample from methyl ethyl ketone and from benzene raised the m. p. to $69.9-70.2^\circ$. After further crystallization from glacial acetic acid the m. p. was $73.0-73.7^\circ$, and the X-ray investigation showed that the specimen consisted of a mixture of the two crystalline forms described for the antipode. Rapid cooling produced the vitreous form, and on heating this form underwent a transition at 65.5° to an opaque solid, which melted at 70.2° . When mixed with an equal amount of the antipode the DL-acid thus produced melted, after crystallization from acetone, at the same temperature as the racemic acid described in Part I, *viz.* $75.6-75.9^\circ$.

In the course of work described in Part V (10), the resolution of DL-methylallyl-acetic acid was repeated. The resolution was performed as described in Part I but, probably due to the use of quinine of very good quality (obtained from N. V. Amsterdamsche Chininefabriek), the rotation now found for the dextrorotatory enantiomorph was higher than that found previously, *viz.* $\alpha_D^{20} + 7.88^\circ$ as compared with $\alpha_D^{10} + 7.62^\circ$ (homogeneous, *l*, 1). The corresponding L(+)-methyl 2-methyl-5-iodopentanoate had $\alpha_D^{20} + 28.12^\circ$ (homogeneous, *l*, 1), $[\alpha]_D^{20} + 18.46^\circ$, $[\text{M}]_D^{20} + 47.3^\circ$.

In view of the above results, the synthesis of the dextrorotatory enantiomorph of 2-methylhexacosanoic acid was repeated, starting with the iodo-ester just mentioned. The L(+)-2-methyl-7-ketohexacosanoic acid melted at 79.2–79.4°, as compared with the value 78.8–79.2° reported in Part I. L(+)-2-Methylhexacosanoic acid obtained by reduction of the keto-acid showed, however, a thermal behaviour practically identical with that described above for the earlier specimen. The optical rotation was also the same within the experimental error. However, the new specimen more nearly resembled the laevorotatory enantiomorph in forming larger and better developed crystals than the earlier specimen.

Experimental¹

1-Iodoheneicosane. The iodide was prepared via the bromide obtained by degradation of silver behenate with bromine according to the method of HUNSDIECKER and HUNSDIECKER (7). The behenic acid used had m. p. 79.8–80.0° (FRANCIS and PIPER (11) give m. p. 79.95°). 1-Bromoheneicosane, m. p. 44.5–45.5°, was obtained in 65 % yield. The bromide was converted into the iodide in 95 % yield by refluxing with sodium iodide in acetone solution. The iodide crystallized from acetone in the form of beautiful lustrous plates, m. p. 48.5–48.8°. The m. p. was unchanged after previous melting. Long X-ray spacing (pressed specimen) 53.2 Å. LEVENE and TAYLOR (12) give m. p. 49–50°.

D(–)-3-Methyl-5-ketoheptacosanoic acid. The acid was prepared from D-methyl 3-keto-5-methylpimelate (9 g) and *n*-heneicosyl iodide (17.6 g), using 20 g of dry potassium carbonate and 70 ml of methyl-*n*-propyl ketone in the alkylation. Hydrolysis and ketonic cleavage were effected by dissolving the alkylation product in benzene (50 ml), and adding the solution to a solution of potassium hydroxide (40 g) in water (40 ml) and methanol (600 ml). The mixture was kept at a temperature of 50° for 20 hours. The keto-acid was isolated and crystallized from light petroleum (b. p. 95–100°). After two crystallizations from this solvent 9.41 g (51 % of the theoretical) of D(–)-3-methyl-5-ketoheptacosanoic acid, m. p. 77.7–77.9°, was obtained in the form of beautiful lustrous plates. After previous melting the m. p. was 77.8–77.9°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 54.8 Å.

Optical rotation $\alpha_D^{21} - 0.37^\circ$ (chloroform; *l*, 4; *c*, 8.57)
 $[\alpha]_D^{21} - 1.08^\circ$ $[M]_D^{21} - 4.7^\circ$

Anal.: Calcd for C₂₈H₅₄O₃ (438.7) C, 76.65; H, 12.41 %
 Found C, 76.72; H, 12.54 %

D(+)-3-Methylheptacosanoic acid (IX). The keto-acid (8.85 g) was reduced by CLEMMENSEN's method in ethanol solution (cf. Part II (2)), using 250 g of amalgamated zinc and 300 ml of 99.5 % ethanol. The total time for the reduction was 32 hours, dry hydrogen chloride being led in at 8 hour intervals. The reaction mixture was worked up in the usual manner. The crude ethyl ester of the reduced acid was dissolved in ethanol and hydrogenated using platinum oxide as catalyst. The hydro-

¹ The melting points, optical rotations and crystal spacings were determined in the manner described in Part I (1).

genated ester was hydrolyzed, and the acid crystallized from light petroleum (b. p. 40–60°). After treatment with charcoal to remove some colloiddally dispersed hydrogenation catalyst, recrystallization from light petroleum (b. p. 40–60°) gave 5.28 g (62 % of the theoretical) of pure D(+)-3-methylheptacosanoic acid, m. p. 73.1° after sintering at 71.6°, in the form of lustrous plates. After previous melting the m. p. was 72.8–73.1°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 45.8 Å.

Optical rotation $\alpha_D^{21} + 0.52^\circ$ (chloroform; l , 4; c , 4.09)
 $[\alpha]_D^{21} + 3.2^\circ$ $[M]_D^{21} + 13.5^\circ$

Anal.: Calcd for $C_{28}H_{56}O_2$ (424.7) C, 79.18; H, 13.29 %
 Found C, 79.19; H, 13.31 %

D-3-Methylheptacosanamide was prepared via the acid chloride (cf. Part I (1)). After crystallization from benzene the amide melted at 105.2–105.4°, unchanged after previous melting. The amide crystallizes from benzene in the form of small lustrous plates. Long X-ray spacing (pressed specimen) 36.5 Å. In melted specimens, this form was found mixed with a form with a long spacing of 45.8 Å.

Anal.: Calcd for $C_{28}H_{57}ON$ (423.7) N, 3.31 %
 Found N, 3.27 %

Degradation of DL-3-methyltetracosanoic acid to DL-2-methyltricosanoic acid. The silver salt of DL-3-methyltetracosanoic acid (Part II (2)) was prepared by mixing a hot solution of the acid (1.05 g) in ethanol (25 ml) containing potassium hydroxide (0.25 g) with a hot solution of silver nitrate (0.51 g) in ethanol (30 ml). After the mixture had cooled to room temperature, the silver salt was filtered off and washed on the filter with hot water followed by ethanol. The salt was dried *in vacuo* at 100°.

The finely divided silver salt was suspended in dry carbon tetrachloride (4 ml), and dry bromine added drop-wise until the bromine colour persisted. The mixture was then refluxed for 30 minutes, and allowed to cool. Ether was added, and the solution washed with water and sodium carbonate solution. The precipitate was removed, and the ether solution washed with water and dried (sodium sulphate). The solvent was evaporated, and the residue crystallized from acetone, giving 0.44 g of DL-1-bromo-2-methyltricosane, m. p. 34–36°. No further purification of this intermediate was attempted, but the analysis was satisfactory.

Anal.: Calcd for $C_{24}H_{49}Br$ (417.6) Br, 19.80 %
 Found Br, 20.07 %

The bromide (0.35 g) was refluxed with a solution of potassium acetate (1 g) in glacial acetic acid (5 ml). After refluxing for 24 hours the bromine content of the organic material had fallen to 14.38 %, *i. e.* less than one third of the bromide had reacted. Most of the bromide had remained undissolved during the refluxing, and in the repetition of the procedure 5 ml of butyl acetate was added to increase the solubility. After further refluxing for 24 hours, the bromine content had fallen to 7.52 %. After refluxing for another period of 24 hours the mixture was worked up, and the crude acetate hydrolyzed by refluxing for 5 hours with potassium hydroxide (1 g) in water (1 ml) and ethanol (15 ml). DL-1-hydroxy-2-methyltricosane was removed from the alkaline reaction mixture by extraction with ether. The ether solution was washed

with water, and dried. After evaporation of the ether the crude alcohol was dissolved in acetone (50 ml, distilled from potassium permanganate) containing 0.3 g of potassium permanganate. The oxidation was allowed to proceed for three days at room temperature (20–21°). The mixture was acidified with sulphuric acid, and perhydrol added to remove excess permanganate and manganese dioxide. The organic material was extracted with ether in the usual manner. The residue after removal of the ether was dissolved in ethanol, and 1 ml of 1-N barium hydroxide in methanol added to the hot solution. After cooling to room temperature the precipitated barium salt was filtered off and thoroughly extracted (twice) with boiling light petroleum (b. p. 40–60°). The barium salt was decomposed with dilute hydrochloric acid, and the free acid dissolved in ether. The residue after removal of the ether was crystallized from light petroleum (b. p. 40–60°). 0.09 G of DL-2-methyltricosanoic acid was obtained in the form of lustrous plates, m. p. 68.0–68.4°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 45.6 Å.

Anal.: Calcd for $C_{24}H_{48}O_2$ (368.6) C, 78.19; H, 13.13 %
 Found C, 78.28; H, 13.12 %

D(+)-1-Bromo-2-methylhexacosane (XI). D(+)-3-Methylheptacosanoic acid (4.43 g) was dissolved in ethanol (100 ml), and the solution mixed with a solution of potassium hydroxide (0.68 g) in ethanol (20 ml). To the hot solution of the potassium salt was added a hot solution of silver nitrate (1.95 g, 10 % excess) in ethanol (100 ml). After cooling, the precipitated silver salt was filtered off and washed on the filter with warm water followed by ethanol. The salt was dried in the dark at 70°, and finally *in vacuo* at 100°. The white dry salt weighed 5.54 g.

The silver salt (5.54 g) was suspended in dry carbon tetrachloride (8 ml), and dry bromine added until the colour of bromine persisted. The mixture was refluxed for one hour. Ether was added, the solution washed with water, and the silver bromide removed. The ether solution was washed twice with sodium carbonate. The precipitate was separated. From this precipitate 0.80 g of pure D(+)-3-methylheptacosanoic acid was recovered. The clear ether solution was dried with sodium sulphate. The solvent was removed by evaporation, and the residue crystallized from acetone, giving 3.12 g (65 % of the theoretical, not counting the recovered acid) of white crystalline D(+)-1-bromo-2-methylhexacosane (XI), m. p. 45.8–46.3°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 37.8 Å.

Optical rotation $\alpha_D^{21} + 0.07$ to 0.08° (chloroform: l, 2; c, 5.8)
 $[\alpha]_D^{21} + 0.6^\circ$ $[M]_D^{21} + 2.7^\circ$

Anal.: Calcd for $C_{27}H_{55}Br$ (459.7) Br, 17.39 %
 Found Br, 17.86 %

D(–)-2-Methylhexacosanoic acid (XIV). The bromide just described (2.91 g) was refluxed for 3 days with potassium acetate (8 g) in glacial acetic acid (40 ml) and butyl acetate (40 ml). The mixture was worked up and the bromine content of the organic material determined. Found: Br, 4.31%. Refluxing was continued for a further period of 24 hours, with 9 g of potassium acetate in 30 ml of glacial acetic acid and 30 ml of butyl acetate. The acetate was isolated in the manner described for DL-compound above, and hydrolyzed by refluxing for 5 hours with potassium hydroxide (10 g) in water (10 ml) and ethanol (150 ml).

The crude alcohol was dissolved in acetone (350 ml) containing 2.5 g of potassium permanganate. The solution was kept at room temperature for 4 days. After acidification with sulphuric acid, perhydrol was added to remove excess permanganate and manganese dioxide, and the organic material taken up in ether. After evaporation of the ether the residue was dissolved in hot ethanol, and a hot solution of barium hydroxide (7 ml of 1-N in methanol was added to 40 ml of methanol-ethanol mixture (1:1 by volume)) stirred in. After cooling to room temperature, the precipitated barium salt was filtered off and dried *in vacuo* at room temperature. The dry salt was extracted twice with boiling light petroleum (b. p. 40–60°). The salt was decomposed by means of hydrochloric acid, and the free acid taken up in ether. The ether solution was washed and dried, and after removal of the solvent the residue was crystallized from light petroleum (b. p. 40–60°). 1.18 G of D(–)-2-methylhexacosanoic acid (XIV) was obtained.

The acid showed a somewhat diffuse m. p., 69.8–71.2°. In previously melted material two melting points were observed, *viz.* 70.2° and *ca* 71.3° respectively. After crystallization from glacial acetic acid, the acid was obtained in the form of elongated thin plates, m. p. 72.9–74.0°. After further crystallization from benzene, the m. p. was 70.2–71.9°. The X-ray investigation showed that crystallization from glacial acetic acid or from benzene always gave a mixture of two crystalline modifications with long spacings of 49.5 and 60 Å respectively. The form with the shorter spacing predominated in material obtained from benzene, and that with the longer spacing in material from glacial acetic acid. On slow cooling solidification usually took place at about 68°, the solid consisting of a mixture of the two crystalline forms mentioned. Sometimes, however, the acid remained liquid down to 65°. At this temperature transparent spheres appeared in the melt, and on further cooling these grew and coalesced, giving a completely transparent solid having an inverted cone air-gap in the centre. If the material was heated before complete solidification had taken place, the transparent spheres disappeared at 68–68.5°. The transparent form appears stable at room temperature, but on heating from this temperature a transition to an opaque solid occurred at 65.5°. The opaque material melted, after some sintering at 70.2°, at 71–73.7° and consisted of a mixture of the two higher melting modifications. Rapid cooling of the melt always produced the transparent form. This form evidently corresponds to a glass, as it failed to give any distinct X-ray reflexions.

Optical rotation $\alpha_D^{21} - 0.57^\circ$ (chloroform; *l*, 2; *c*, 4.21)
 $[\alpha]_D^{21} - 6.8^\circ$. $[M]_D^{21} - 28^\circ$

Anal.: Calcd for $C_{27}H_{54}O_2$ (410.7) C, 78.95; H, 13.25 %
 Found C, 78.79; H, 13.17 %

D-2-Methylhexacosanamide was prepared in the manner described in Part I for the antipode. After one crystallization from light petroleum (b. p. 40–60°), and one from methanol the *amide* melted at 115.3–115.7°, unchanged after previous melting.

Anal.: Calcd for $C_{27}H_{55}ON$ (409.7) N, 3.42 %
 Found N, 3.42 %

The analyses have been performed by Mr. W. KIRSTEN and Mr. I. ALPEROWICZ in the microanalytical laboratory of this Institute. The author is furthermore indebted

to Farm. kand. GUNNEL STÄLLBERG for the preparation of 1-iodoheneicosane, and to Mr. L. AHLQUIST for assistance in the synthetic work. The expenses involved in this work have been defrayed by grants from the Swedish National Anti-tuberculosis Association and from the Rockefeller Foundation.

SUMMARY

The synthesis of D(—)-2-methylhexacosanoic acid by degradation of D(+)-3-methylheptacosanoic acid is described. The silver salt of the latter acid is subjected to degradation by means of bromine according to the method of HUNSDIECKER and HUNSDIECKER, giving D(+)-1-bromo-2-methylhexacosane. The bromide is converted into the acetate of the corresponding alcohol, and the latter oxidized to D(—)-2-methylhexacosanoic acid. The acid is purified via the barium salt. The laevorotatory acid shows numerically the same rotation and the same properties as the antipode synthesized via an entirely different route. The polymorphism of the enantiomorphic 2-methylhexacosanoic acids is described.

The synthesis now described represents an independent confirmation of the previously derived steric relations between optically active α - and β -methyl substituted monocarboxylic acids.

Institute of Medical Chemistry, University of Uppsala.

REFERENCES: 1. Ställberg-Stenhagen, S., Arkiv för Kemi, Min. o. Geol. 23 A, No. 15 (1946). — 2. *Idem, ibid.*, 26 A, No. 1 (1948). — 3. v. Braun, J., and Jostes, F., Berichte 59, 1091 (1926). — 4. *Idem, ibid.*, 59, 1444 (1926). — 5. Cf. e. g. rules laid down 1947 by the Committee on Nomenclature, Spelling and Pronunciation of the American Chemical Society, as reported by Vickery, H. B., J. Biol. Chem. 169, 237 (1947), and Crane, E. J., Chem. Eng. News, 25, 1363 (1947). — 6. Ladenburg, A., Berichte 29, 1254 (1896). — 7. Hunsdiecker, H., and Hunsdiecker, Cl., Berichte 75, 291 (1942). — 8. Price, C. C., Mechanisms of reactions at carbon-carbon double bonds, New York 1946, p. 55. — 9. Arnold, R. T., and Morgan, P., J. Amer. Chem. Soc. 70, 4248 (1948). — 10. Ställberg-Stenhagen, S., Arkiv för Kemi 1, Nr 21 (1949). — 11. Francis, F., and Piper, S. H., J. Amer. Chem. Soc. 61, 577 (1939). — 12. Levene, P. A., and Taylor, F. A., J. Biol. Chem. 59, 905 (1924).

Tryckt den 6 maj 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über die Schardingerdextrine

II. Berechnung der sauren Hydrolyse

Von KARL MYRBÄCK

Mit 4 Figuren im Text

Die sog. Schardingerdextrine werden von *Bacillus macerans* bzw. daraus gewonnenen Enzymlösungen aus Stärke, deren Komponenten, Glykogen und gewissen Abbauprodukten dieser Stoffe erzeugt. Alle bekannten Tatsachen sind mit der zuerst von FREUDENBERG (1) geäusserten Auffassung im Einklang, dass die Schardingerdextrine ringförmig gebaut sind, und dass die Glucosereste durch lauter α -glucosidische 1,4-Bindungen („Maltosebindungen“) verknüpft sind. Nach FREUDENBERG enthält das α -Dextrin Schardingers fünf, das β -Dextrin sechs Glucoseeinheiten. Diese Zahlen gehen aus den Röntgenmessungen von KRETKY und SCHNEIDMESSER (2) sowie aus Molekulargewichtsbestimmungen an den kristallisierten Methylverbindungen hervor. FRENCH und RUNDLE (3) finden dagegen ihre Messungen mit der Annahme besser vereinbar, dass das α -Dextrin sechs, das β -Dextrin sieben Einheiten enthält.

Die saure Hydrolyse der Schardingerdextrine ist früher von FREUDENBERG (1) sowie von SWANSON und CORI (4) untersucht worden. FREUDENBERG hat besonders die Veränderung der optischen Drehung während der Hydrolyse festgestellt. Gegen die Versuche von SWANSON und CORI kann der Einwand gemacht werden, dass ein ungeeignetes hydrolysierendes Agens, nämlich konzentrierte Salzsäure angewendet wurde.

In einer vorangehenden Arbeit (5) wurde gezeigt, dass die Hydrolyse des Schardingerschen β -Dextrins wenigstens *nicht* unter der einfachen Annahme berechnet werden kann, dass sämtliche Glucosidbindungen aller infragekommenen Saccharide einschliesslich der ringförmigen mit derselben Geschwindigkeit gesprengt werden. Dies war ja schon aus dem Grunde nicht zu erwarten, dass nach FREUDENBERG in offenen Sacchariden, auch wenn alle Glucosidbindungen an sich gleich sind, die Hydrolysegeschwindigkeit einer einzelnen Bindung nicht denselben Wert hat. Vielmehr nimmt in der Maltosereihe mit steigendem Polymerisationsgrad die Hydrolysegeschwindigkeit ab. Die Hydrolysegeschwindigkeit der Bindung der Maltose ist grösser als die mittlere Hydrolysegeschwindigkeit der beiden Bindungen der Maltotriose usw. Für Saccharide mit offenen Ketten, einer und derselben Reihe (Maltosereihe, Cellobiosereihe) gehörig, hat FREUDENBERG versucht, die Hydrolysegeschwindigkeit unter verschiedenen Annahmen zu berechnen. Man kann z. B. annehmen, dass die Bindung der Maltose schneller gespalten wird als alle andere Bindungen, die unter sich gleich schnell

angegriffen werden. Oder man kann annehmen, dass in jedem Saccharid die beiden endständigen Bindungen schneller gespalten werden als die mittleren. Die mit dem experimentellen Material am besten vereinbare Annahme scheint die zu sein, dass in jedem Saccharid *eine* endständige Bindung schneller gelöst wird. Dies erscheint ja durchaus verständlich, da die Bindung, die die reduzierende Endgruppe mit dem Rest des Moleküls verknüpft, gewissermassen von den anderen Glucosidbindungen des Saccharids verschieden ist. In einem Saccharid mit n Glucosidbindungen der Maltosereihe werden also $n-1$ Bindungen mit der Geschwindigkeit k , eine Bindung aber mit der grösseren Konstante αk . k ist gleich der Hydrolysekonstante einer sehr langen Kette und αk die Hydrolysenkonstante der Maltose. Nach Untersuchungen von FREUDENBERG (1) und MYRBÄCK und Mitarbeiter (6) ist $\alpha = 1,4 - 1,5$; SWANSON und CORI finden dagegen $\alpha = 1$. SWANSON und CORI finden (in konzentrierter Salzsäure bei Zimmertemperatur) einen monomolekularen Verlauf der Hydrolyse der Amylose und sehen darin einen Beweis für die Richtigkeit ihrer mit einem alkalischen Kupferreagenz ausgeführten Bestimmungen des Hydrolysegrades. Sie finden für die Hydrolyse von Amylose und von Maltose dieselbe Konstante. Nach unseren Versuchen in verdünnter Schwefelsäure wie aus denen von FREUDENBERG in 51 % Schwefelsäure verläuft die Maltosehydrolyse monomolekular; die Konstante ist aber bedeutend grösser als die der Hydrolyse der Saccharide mit längeren Ketten. Im letzten Fall steigen ausserdem die monomolekularen Koeffiziente stark an, wie z. B. aus folgendem Versuch von G. LINDSTEDT hervorgeht: Tabelle 1.

Tabelle 1.

Hydrolyse einer 0,8 % Amyloselösung in 51 % Schwefelsäure bei 30°. Hydrolysegrad durch Titrierung nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL festgestellt.

Zeit, Stunden	Hydrolyse- grad, α	$k = \frac{1}{t} \log \frac{1}{1 - \alpha}$
4	0,134	0,016
6	0,191	0,015
8	0,236	0,015
10,5	0,376	0,020
12	0,407	0,019
14	0,440	0,018
17	0,583	0,022
19	0,630	0,023
23	0,686	0,022
28	0,865	0,031
32	0,890	0,030
36	0,925	0,031
38	0,955	0,035
42	0,975	0,038
53	1,00	—

Wir müssen also damit rechnen, dass in den Sacchariden mit offenen Ketten die Hydrolysegeschwindigkeit mit abnehmender Kettenlänge zunimmt.

Bei der Hydrolyse der Schardingerdextrine können die Verhältnisse noch dadurch kompliziert werden, dass die Glucosidbindungen im Ring eine Hydrolysekonstante zeigen, die weder mit k noch mit αk übereinstimmt. An und für

sich könnte ja wahrscheinlich erscheinen, dass die Hydrolysekonstante k_r der Ringbindungen gleich k sein sollte, da ja Endgruppen fehlen; es muss aber beachtet werden, dass der Ring verhältnismässig starr ist. Die Glucosidbindungen haben eine ziemlich festgelegte Lage im Raum, während in den Sacchariden mit offenen Ketten die Drehbarkeit um die C—O-Bindungen alle mögliche Formen der Moleküle zulässt. Man muss also damit rechnen dass k_r von k verschieden ist.

Im folgenden wird die Hydrolyse der Schardingerdextrine unter verschiedenen Annahmen berechnet:

1) Alle inneren Bindungen der Saccharide mit offenen Ketten werden mit der Konstante k gespalten.

2) Eine oder beide terminale Bindungen dieser Saccharide werden mit einer grösseren Geschwindigkeit $a k$ gespalten, wobei a nach dem obigen vom Wert 1,5 nicht sehr verschieden sein kann.

3) Die Glucosidbindungen im Ring werden mit einer Konstante $b k$ gespalten, wobei b wahrscheinlich kleiner als 1 ist; die Berechnung wird aber auch für einige Werte $b > 1$ durchgeführt.

Bezeichnungen:

t Zeit der Hydrolyse.

α Hydrolysegrad.

c_{5R} , c_{6R} , c_{7R} die molaren Konzentrationen der ringförmigen Dextrine mit 5 bzw. 6 oder 7 Einheiten im Ring.

c_1 , $c_2 \dots c_7$ die molaren Konzentrationen der Saccharide mit offenen Ketten, 1—7 Glucoseeinheiten enthaltend.

$x = e^{-kt}$, wobei e = Basis der natürlichen Logarithmen.

I. Spaltung von ringförmigen Dextrinen mit 5, 6 bzw. 7 Glucoseeinheiten im Ring: Spaltungsgeschwindigkeit aller Bindungen = k

a) Spaltung des Dextrins mit 5 Einheiten im Ring

1. Differentialgleichungen

$$\frac{dc_{5R}}{dt} = -5k c_{5R}$$

$$\frac{dc_5}{dt} = 5k c_{5R} - 4k c_5$$

$$\frac{dc_4}{dt} = 2k c_5 - 3k c_4$$

$$\frac{dc_3}{dt} = 2k (c_5 + c_4) - 2k c_3$$

$$\frac{dc_2}{dt} = 2k (c_5 + c_4 + c_3) - k c_2$$

$$\frac{dc_1}{dt} = 2k (c_5 + c_4 + c_3 + c_2)$$

2. Die Integration ergibt

$$\begin{aligned}c_{5R} &= x^5 \\c_5 &= 5x^4(1-x) \\c_4 &= 5x^3(1-x)^2 \\c_3 &= 5x^2(1-x)^2 \\c_2 &= 5x(1-x)^2 \\c_1 &= 5(1-x)^2\end{aligned}$$

3. Der Hydrolysegrad

$$\alpha = 1 - x$$

b. Spaltung des Dextrins mit 6 Einheiten im Ring

1. Die Differentialgleichungen entsprechen ganz den oben unter a) gegebenen.
2. Die Integration ergibt

$$\begin{aligned}c_{6R} &= x^6 \\c_6 &= 6x^5(1-x) \\c_5 &= 6x^4(1-x)^2 \\c_4 &= 6x^3(1-x)^2 \\c_3 &= 6x^2(1-x)^2 \\c_2 &= 6x(1-x)^2 \\c_1 &= 6(1-x)^2\end{aligned}$$

3. Der Hydrolysegrad

$$\alpha = 1 - x$$

c. Spaltung des Dextrins mit 7 Einheiten im Ring

1. Die Differentialgleichungen entsprechen den oben unter a) und b) gegebenen.
2. Die Integration ergibt

$$\begin{aligned}c_{7R} &= x^7 \\c_7 &= 7x^6(1-x) \\c_6 &= 7x^5(1-x)^2 \\c_5 &= 7x^4(1-x)^2 \\c_4 &= 7x^3(1-x)^2 \\c_3 &= 7x^2(1-x)^2 \\c_2 &= 7x(1-x)^2 \\c_1 &= 7(1-x)^2\end{aligned}$$

3. Der Hydrolysegrad

$$\alpha = 1 - x$$

Aus dem obigen geht u. a. hervor, dass bei einem gegebenen Hydrolysegrad und bei gleichbleibendem Wert von k die prozentischen Ausbeuten an den Sacchariden mit 1–4 Glucoseresten in allen drei Fällen dieselben sind. Bei zunehmendem Hydrolysegrad nimmt die Konzentration des ringförmigen Dextrins um so schneller ab je grösser der Ring ist.

Schon aus den von uns bisher ausgeführten Messungen geht hervor, dass die Hydrolyse der Schardingerdextrine nicht nach den oben gegebenen Formeln berechnet werden kann. Erstens steigt die Ausbeute an Glucose mit steigendem Hydrolysegrad viel schneller als berechnet an, was ja schon nach älteren Untersuchungen von FREUDENBERG und vom Verfasser zu erwarten war. Zweitens geht aus unseren Versuchen sowie denen von SWANSON und CORI hervor, dass die Konstante k_r der Ringsprengung von den Konstanten der Hydrolyse der Saccharide mit offenen Ketten verschieden sein muss.

II. Spaltung eines ringförmigen Dextrins mit sechs Glucoseresten: Drei verschiedene Geschwindigkeitskonstanten.

Wie schon erwähnt geht aus älteren Untersuchungen hervor, dass die Geschwindigkeitskonstante k_2 der Hydrolyse der Maltose etwa $1,5k$ ist, wobei k die Spaltungsgeschwindigkeit einer inneren Maltosebindung in einer sehr langen Kette ist. Es kann versuchsweise angenommen werden, dass in sämtlichen hier infragekommenden Sacchariden mit offenen Ketten je eine Bindung mit der Geschwindigkeit $k_2 = 1,5k$, alle übrigen Bindungen mit der Geschwindigkeit k gespalten werden. Über die Grösse der Konstante k_r der Ringsprengung ist dagegen wenig bekannt. Wahrscheinlich dürfte sie kleiner als k sein. Im folgenden wird die Spaltung für einige verschiedene Werte von k_r durchgeführt.

a) Berechnung unter der Annahme dass die drei Konstanten folgende Werte haben: $k_r = 0,1k$; k ; $k_2 = 1,5k$

1. Die Differentialgleichungen

$$\frac{dc_{6R}}{dt} = -0,6k$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 0,6kc_{6R} - 5,5kc_6$$

$$\frac{dc_5}{dt} = 2,5kc_6 - 4,5kc_5$$

$$\frac{dc_4}{dt} = 2kc_6 + 2,5kc_5 - 3,5kc_4$$

$$\frac{dc_3}{dt} = 2k(c_6 + c_5) + 2,5kc_4 - 2,5kc_3$$

$$\frac{dc_2}{dt} = 2k(c_6 + c_5 + c_4) + 2,5kc_3 - 1,5kc_2$$

$$\frac{dc_1}{dt} = 2,5k(c_6 + c_5 + c_4 + c_3) + 3kc_2$$

2. Die Integration ergibt

$$c_{6R} = x^{0,6}$$

$$c_6 = 0,122\,449 (x^{0,6} - x^{5,5})$$

$$c_5 = 0,078\,493 x^{0,6} + 0,306\,123 x^{5,5} - 0,384\,615 x^{4,5}$$

$$c_4 = 0,152\,114 x^{0,6} - 0,260\,204 x^{5,5} + 0,961\,539 x^{4,5} - 0,853\,448 x^{3,5}$$

$$c_3 = 0,411\,668 x^{0,6} + 0,094\,388 x^{5,5} - 0,817\,308 x^{4,5} + \\ + 2,133\,621 x^{3,5} - 1,822\,368 x^{2,5}$$

$$c_2 = 1,928\,090 x^{0,6} - 0,020\,727 x^{5,5} + 0,296\,474 x^{4,5} - \\ - 1,813\,577 x^{3,5} + 4,555\,921 x^{2,5} - 4,946\,180 x^{1,5}$$

$$c_1 = -12,826\,798 x^{0,6} + 0,003\,189 x^{5,5} - 0,064\,103 x^{4,5} + \\ + 0,640\,086 x^{3,5} - 3,644\,736 x^{2,5} + 9,892\,361 x^{1,5} + 6$$

3. Der Hydrolysegrad

$$\alpha = -1,688\,997 x^{0,6} + 0,000\,053 x^{5,5} - 0,001\,336 x^{4,5} + \\ + 0,017\,780 x^{3,5} - 0,151\,864 x^{2,5} + 0,824\,363 x^{1,5} + 1$$

b) Berechnung unter Annahme der Konstanten: $k_r = 0,3 k$; k ; $k_2 = 1,5 k$

1) Die Differentialgleichungen sind

$$\frac{d c_{6R}}{dt} = -1,8 k c_{6R}$$

$$\frac{d c_6}{dt} = 1,8 k c_{6R} - 5,5 k c_6$$

usw.

2) Die Integration ergibt

$$c_{6R} = x^{1,8}$$

$$c_6 = 0,486\,486 (x^{1,8} - x^{5,5})$$

$$c_5 = 0,450\,450 x^{1,8} + 1,216\,216 x^{5,5} - 1,666\,667 x^{4,5}$$

$$c_4 = 1,234\,764 x^{1,8} - 1,033\,784 x^{5,5} + 4,166\,667 x^{4,5} - 4,367\,647 x^{3,5}$$

$$c_3 = 7,086\,834 x^{1,8} + 0,375\,000 x^{5,5} - 3,541\,667 x^{4,5} + \\ + 10,919\,118 x^{3,5} - 14,839\,285 x^{2,5}$$

$$c_2 = -73,534\,958 x^{1,8} - 0,082\,348 x^{5,5} + 1,284\,722 x^{4,5} - \\ - 9,281\,250 x^{3,5} + 37,098\,212 x^{2,5} + 44,515\,621 x^{1,5}$$

$$c_1 = 109,699\,186 x^{1,8} + 0,012\,669 x^{5,5} - 0,277\,778 x^{4,5} + \\ + 3,275\,735 x^{3,5} - 29,678\,570 x^{2,5} - 89,031\,242 x^{1,5} + 6$$

3) Der Hydrolysegrad

$$\alpha = 7,570\,461\,x^{1,8} + 0,000\,211\,x^{5,5} - 0,005\,787\,x^{4,5} + \\ + 0,090\,993\,x^{3,5} - 1,236\,607\,x^{2,5} - 7,419\,270\,x^{1,5} + 1$$

 c) Berechnung unter Annahme der Konstanten: $k_r = k/2$; k ; $k_2 = 3k/2$

1) Die Differentialgleichungen sind

$$\frac{dc_{6R}}{dt} = -3k c_{6R}$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 3k c_{6R} - 11/2 k c_6$$

usw.

2) Die Integration ergibt

$$c_{6R} = x^3$$

$$c_6 = \frac{6}{5}(x^3 - x^{11/2})$$

$$c_5 = 2x^3 + 3x^{11/2} - 5x^{9/2}$$

$$c_4 = \frac{74}{5}x^3 - \frac{51}{20}x^{11/2} + \frac{25}{2}x^{9/2} - \frac{99}{4}x^{7/2}$$

$$c_3 = -\frac{434}{5}x^3 + \frac{37}{40}x^{11/2} - \frac{85}{8}x^{9/2} + \frac{495}{8}x^{7/2} + \frac{277}{8}x^{5/2}$$

$$c_2 = \frac{362}{3}x^3 - \frac{13}{64}x^{11/2} + \frac{185}{48}x^{9/2} - \frac{1683}{32}x^{7/2} - \frac{1385}{16}x^{5/2} + \frac{2849}{192}x^{3/2}$$

$$c_1 = -\frac{190}{3}x^3 + \frac{1}{32}x^{11/2} - \frac{5}{6}x^{9/2} + \frac{297}{16}x^{7/2} + \frac{277}{4}x^{5/2} - \frac{2849}{96}x^{3/2} + 6$$

3) Der Hydrolysegrad

$$\alpha = -\frac{86}{45}x^3 + \frac{1}{1920}x^{11/2} - \frac{5}{288}x^{9/2} + \frac{33}{64}x^{7/2} + \frac{277}{96}x^{5/2} - \frac{2849}{1152}x^{3/2} + 1$$

 d) Berechnung unter Annahme der Konstanten: $k_r = 0,7k$; k ; $k_2 = 1,5k$

1) Die Differentialgleichungen sind

$$\frac{dc_{6R}}{dt} = -4,2k c_{6R}$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 4,2k c_{6R} - 5,5k c_6$$

usw.

2) Die Integration ergibt

$$c_{6R} = x^{4,2}$$

$$c_6 = 3,230\,769 (x^{4,2} - x^{5,5})$$

$$c_5 = 26,923\,077 x^{4,2} + 8,076\,923 x^{5,5} - 35 x^{4,5}$$

$$c_4 = -105,384\,614 x^{4,2} - 6,865\,385 x^{5,5} + 87,5 x^{4,5} + 24,749\,999 x^{3,5}$$

$$c_3 = 119,502\,261 x^{4,2} + 2,490\,385 x^{5,5} - 74,375 x^{4,5} - \\ - 61,874\,997 x^{3,5} + 14,257\,351 x^{2,5}$$

$$c_2 = -54,923\,747 x^{4,2} - 0,546\,875 x^{5,5} + 26,979\,167 x^{4,5} + \\ + 52,593\,747 x^{3,5} - 35,643\,377 x^{2,5} + 11,541\,082 x^{1,5}$$

$$c_1 = 12,879\,168 x^{4,2} + 0,084\,135 x^{5,5} - 5,833\,333 x^{4,5} - \\ - 18,562\,499 x^{3,5} + 28,514\,701 x^{2,5} - 23,082\,163 x^{1,5} + 6$$

3) Der Hydrolysegrad

$$\alpha = 0,371\,152 x^{4,2} + 0,001\,402 x^{5,5} - 0,121\,528 x^{4,5} - \\ - 0,515\,625 x^{3,5} + 1,188\,113 x^{2,5} - 1,923\,514 x^{1,5} + 1$$

e) Berechnung unter Annahme der Konstanten: $k_r = k$; k ; $k_2 = 1,5 k$

1) Die Differentialgleichungen sind

$$\frac{dc_{6R}}{dt} = -6 k c_{6R}$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 6 k c_{6R} - 5,5 k c_6$$

usw.

2) Die Integration ergibt

$$c_{6R} = x^6$$

$$c_6 = 12 (-x^6 + x^{11/2})$$

$$c_5 = 20 x^6 - 30 x^{11/2} + 10 x^{9/2}$$

$$c_4 = -\frac{52}{5} x^6 + \frac{51}{2} x^{11/2} - 25 x^{9/2} + \frac{99}{10} x^{7/2}$$

$$c_3 = \frac{20}{7} x^6 - \frac{37}{4} x^{11/2} + \frac{85}{4} x^{9/2} - \frac{99}{4} x^{7/2} + \frac{277}{28} x^{5/2}$$

$$c_2 = -\frac{164}{315} x^6 + \frac{65}{32} x^{11/2} - \frac{185}{24} x^{9/2} + \frac{1683}{80} x^{7/2} - \frac{1385}{56} x^{5/2} + \frac{2849}{288} x^{3/2}$$

$$c_1 = \frac{22}{315} x^6 - \frac{5}{16} x^{11/2} + \frac{5}{3} x^{9/2} - \frac{2079}{280} x^{7/2} + \frac{277}{14} x^{5/2} - \frac{2849}{144} x^{3/2} + 6$$

3) Der Hydrolysegrad:

$$a = \frac{1}{945} x^6 - \frac{1}{192} x^{11/2} + \frac{5}{144} x^{9/2} - \frac{33}{160} x^{7/2} + \frac{277}{336} x^{5/2} - \frac{2849}{1728} x^{3/2} + 1$$

f) Ähnliche Berechnungen wurden für die folgenden Fälle durchgeführt:

$$k_r = 2k; k; k_2 = 1,5k$$

$$k_r = 5k; k; k_2 = 1,5k$$

$$k_r = 10k; k; k_2 = 1,5k$$

$$k_r = \infty; k; k_2 = 1,5k.$$

III. Spaltung eines ringförmigen Dextrins mit sieben Glucoseresten im Ring

Die Berechnungen sind den obigen völlig analog. Hier soll nur der Fall angeführt werden, in welchem angenommen wird, dass sämtliche Bindungen mit der Konstante k gespalten werden, beide terminale Bindungen der Saccharide mit offenen Ketten ausgenommen, die die Konstante $k_2 = 1,4k$ haben.

1) Die Differentialgleichungen sind

$$\frac{dc_{7R}}{dt} = -7kc_{7R}$$

$$\frac{dc_7}{dt} = 7kc_{7R} - 6,8kc_7$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 2,8kc_7 - 5,8kc_6$$

$$\frac{dc_5}{dt} = 2kc_7 + 2,8kc_6 - 4,8kc_5$$

$$\frac{dc_4}{dt} = 2k(c_7 + c_6) + 2,8kc_5 - 3,8kc_4$$

$$\frac{dc_3}{dt} = 2k(c_7 + c_6 + c_5) + 2,8kc_4 - 2,8kc_3$$

$$\frac{dc_2}{dt} = 2k(c_7 + c_6 + c_5 + c_4) + 2,8kc_3 - 1,4kc_2$$

$$\frac{dc_1}{dt} = 2,8k(c_7 + c_6 + c_5 + c_4 + c_3 + c_2)$$

2) Die Integration ergibt

$$c_{7R} = x^7$$

$$c_7 = 35(-x^7 + x^{6,8})$$

$$c_6 = 81,666\,667x^7 - 98x^{6,8} + 16,333\,333x^{5,8}$$

$$c_5 = -72,121\,212x^7 + 102,2x^{6,8} - 45,733\,333x^{5,8} + 15,654\,545x^{4,8}$$

$$c_4 = 33,939\,393x^7 - 53,386\,667x^{6,8} + 47,693\,333x^{5,8} -$$

$$-43,832\,727x^{4,8} + 15,586\,667x^{3,8}$$

$$\begin{aligned}
c_3 &= -10,505\,050\,x^7 + 17,770\,667\,x^{6,8} - 24,913\,777\,x^{5,8} + \\
&\quad + 45,711\,273\,x^{4,8} - 43,642\,668\,x^{3,8} + 15,579\,555\,x^{2,8} \\
c_2 &= 2,222\,222\,x^7 - 3,960\,099\,x^{6,8} + 7,539\,070\,x^{5,8} - 21,069\,176\,x^{4,8} + \\
&\quad + 37,927\,557\,x^{3,8} - 31,159\,110\,x^{2,8} + 8,499\,536\,x^{1,4} \\
c_1 &= -0,080\,808\,x^7 + 0,154\,864\,x^{6,8} - 0,443\,475\,x^{5,8} + 2,062\,716\,x^{4,8} - \\
&\quad - 7,273\,778\,x^{3,8} + 15,579\,555\,x^{2,8} - 16,999\,072\,x^{1,4} + 7
\end{aligned}$$

3) *Der Hydrolysegrad*

$$\begin{aligned}
\alpha &= 0,017\,316\,x^7 - 0,031\,605\,x^{6,8} + 0,067\,879\,x^{5,8} - \\
&\quad - 0,210\,481\,x^{4,8} + 0,371\,111\,x^{3,8} - 1,214\,219\,x^{1,4} + 1
\end{aligned}$$

IV. Hydrolysegrad und Ausbeute an verschiedenen Produkten bei gewissen Werten von $x = e^{-kt}$

Der Verlauf der Hydrolyse des Schardingerdextrins mit sechs Einheiten wurde nach den oben unter II gegebenen Formeln berechnet. Die berechneten Werte sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Die Ausbeuten an den verschiedenen Hydrolyseprodukten sind in % berechnet.

Tabelle 2.

$x = e^{-kt}$	α	6 c_{6R}	6 c_6	5 c_5	4 c_4	3 c_3	2 c_2	c_1
a) Die Konstanten $k_r = 0,1\,k$; k ; $k_2 = 1,5\,k$								
0,1	0,6013	25,12	3,08	1,64	2,53	4,92	11,39	51,32
0,2	0,4281	38,07	4,66	2,48	3,70	6,56	12,23	32,31
0,4	0,2192	57,71	6,99	3,43	4,48	6,35	8,46	12,61
0,6	0,1006	73,60	8,27	3,13	3,35	3,78	3,87	4,02
0,8	0,0333	87,47	7,12	1,46	1,22	1,12	0,91	0,72
0,9	0,0131	93,87	4,64	0,48	0,35	0,29	0,22	0,15
b) Die Konstanten $k_r = 0,3\,k$; k ; $k_2 = 1,5\,k$								
0,1	0,8815	1,59	0,77	0,58	1,22	3,44	11,88	80,51
0,2	0,7325	5,52	2,67	1,99	3,69	8,11	18,48	59,50
0,4	0,4566	19,22	9,04	5,63	8,09	12,38	17,56	28,10
0,6	0,2400	39,87	16,47	7,13	7,83	9,09	9,50	10,11
0,8	0,0890	66,92	18,30	3,94	3,31	3,04	2,54	1,95
0,9	0,0372	82,72	12,99	1,38	1,01	0,84	0,60	0,45
c) Die Konstanten $k_r = 0,5\,k$; k ; $k_2 = 1,5\,k$								
0,1	0,9292	0,10	0,12	0,15	0,49	2,10	9,99	87,05
0,2	0,8169	0,80	0,94	1,07	2,56	6,95	18,62	69,06
0,4	0,5622	6,40	6,90	5,57	8,75	14,35	21,65	36,41
0,6	0,3270	21,60	18,69	9,23	10,48	12,39	13,25	14,36
0,8	0,1335	51,20	26,27	5,96	5,03	4,67	3,81	3,07
0,9	0,0586	72,90	20,26	2,20	1,61	1,38	0,96	0,71

(Forts.)

$x=e^{-kt}$	a	$6\ c_{6R}$	$6\ c_6$	$5\ c_5$	$4\ c_4$	$3\ c_3$	$2\ c_2$	c_1
d) Die Konstanten $k_r = 0,7\ k$; $k_1\ k_2 = 1,5\ k$								
0,1	0,9428	0,01	0,02	0,05	0,27	1,53	8,87	89,25
0,2	0,8478	0,12	0,33	0,61	1,87	5,96	17,95	73,16
0,4	0,6186	2,13	4,81	4,95	8,53	14,85	23,48	41,25
0,6	0,3823	11,70	18,35	10,26	12,03	14,49	15,77	17,41
0,8	0,1689	39,17	31,87	7,61	6,42	6,01	4,94	3,98
0,9	0,0778	64,24	26,57	2,93	2,23	1,74	1,35	0,94
e) Die Konstanten $k_r = k$; $k_1\ k_2 = 1,5\ k$								
0,1	0,9505		0,02	0,16	1,21		8,03	90,58
0,2	0,8598	0,01	0,10	0,35	1,36	5,13	17,08	75,98
0,4	0,6585	0,41	2,86	4,13	7,89	14,76	24,59	45,36
0,6	0,4324	4,67	16,29	10,83	13,15	16,36	18,17	20,53
0,8	0,2092	26,22	37,13	9,49	8,14	7,59	6,33	5,10
0,9	0,1025	53,14	34,50	3,96	2,91	2,42	1,79	1,27
f) Die Konstanten $k_r = 2\ k$; $k_1\ k_2 = 1,5\ k$								
0,1	0,9572		0,01	0,10	0,94		7,14	91,81
0,2	0,8841		0,01	0,19	0,94	4,21	15,82	78,82
0,4	0,6904		1,19	2,91	6,61	13,84	26,91	48,53
0,6	0,4935	0,22	10,72	10,41	13,82	18,25	21,31	25,29
0,8	0,2800	6,87	41,42	12,92	11,37	10,79	9,14	7,49
0,9	0,1603	28,24	51,28	6,50	4,83	4,02	3,00	2,12
g) Die Konstanten $k_r = 5\ k$; $k_1\ k_2 = 1,5\ k$								
0,1	0,9605		0,01	0,09	0,82		6,67	92,41
0,2	0,8927		0,01	0,14	0,79	3,76	15,03	80,27
0,4	0,7200		0,79	2,32	5,79	12,98	24,98	53,14
0,6	0,5261		7,38	9,24	13,32	18,64	22,87	28,55
0,8	0,3262	0,12	35,74	15,03	13,82	13,54	11,79	9,96
0,9	0,2250	4,24	63,40	10,08	7,59	6,45	4,75	3,49
h) Die Konstanten $k_r = 10\ k$; $k_1\ k_2 = 1,5\ k$								
0,1	0,9615		0,01	0,08	0,79		6,53	92,59
0,2	0,8953		0,01	0,10	0,74	3,63	14,77	80,71
0,4	0,7265		0,71	2,17	5,54	12,68	24,87	54,02
0,6	0,5361		6,63	8,79	13,03	18,63	23,26	29,65
0,8	0,3407		32,28	15,28	14,44	14,37	12,72	10,93
0,9	0,2450	0,18	61,47	11,71	8,97	7,65	5,81	4,21
i) Die Konstanten $k_r = \infty$; $k_1\ k_2 = 1,5\ k^*$								
0,1	0,9621		0,01	0,07	0,75		6,39	92,79
0,2	0,8977		0,01	0,12	0,71	3,50	14,52	81,14
0,4	0,7325		0,65	2,03	5,31	12,37	24,72	54,92
0,6	0,5459		6,02	8,37	12,72	18,54	23,61	30,75
0,8	0,3545		29,31	15,27	14,80	15,07	13,60	11,96
0,9	0,2596		56,02	12,98	10,21	8,87	6,87	5,08
j) Alle drei Konstanten $= k$								
0,1	0,9		0,01	0,04	0,32	2,43	16,20	81,00
0,2	0,8	0,01	0,15	0,51	2,05	7,68	25,60	64,00
0,4	0,6	0,41	3,68	4,61	9,22	17,28	28,80	36,00
0,6	0,4	4,67	18,66	10,37	13,82	17,28	19,20	16,00
0,8	0,2	26,21	39,32	8,19	8,19	7,68	6,40	4,00
0,9	0,1	53,14	35,43	3,28	2,92	2,43	1,80	1,00

* Dies entspricht selbstverständlich der Hydrolyse eines Hexasaccharids mit offener Kette!

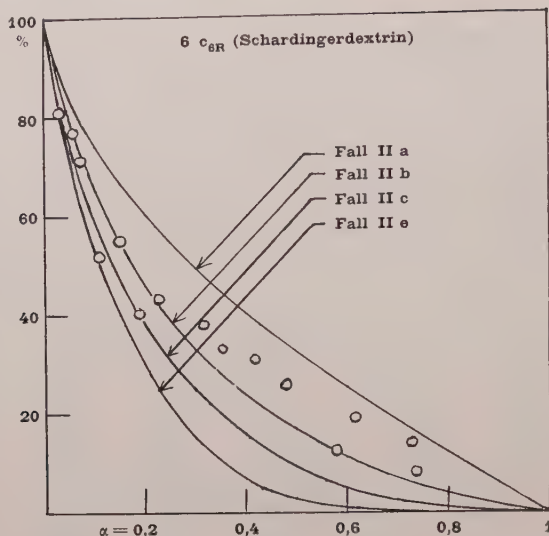


Abb. 1. Abnahme des Substrates (Schardingerdextrin) während der Hydrolyse.

Die Grössen α , c_{6R} , c_1 und $2c_2 + 3c_3$ sind wie schon erwähnt experimentell bestimmbar.*

Um die Übereinstimmung der experimentell gewonnenen Werte mit der einen oder anderen Formel zu prüfen, habe ich in den Abbildungen 1—3 die berechneten prozentischen Ausbeuten an den Produkten c_1 , $6c_{6R}$ und $2c_2 + 3c_3$ gegen α aufgetragen. Die ausgezogenen Kurven sind der Tabelle 2, die experimentell bestimmten Werte den Tabellen 8 und 9 der unten (5) zitierten Arbeit entnommen. c_1 (Glucose) einerseits und $2c_2 + 3c_3$ (Maltose + Maltotriose) andererseits wurden durch Gärversuche mit Presshefe bestimmt, $6c_{6R}$ durch Ausfällung des noch vorhandenen β -Dextrins mit Trichloräthylen.

Betrachten wir zunächst die Abbildung 1, so ist offenbar nach einer gewissen Versuchszeit die noch vorhandene Menge des β -Dextrins viel grösser als was man unter der Annahme berechnet, dass $k_r = k$ ist (Fall II e). Die experimentell gefundenen Punkte fallen mit der Kurve recht gut zusammen, die unter der Annahme dreier verschiedener Konstanten, $k_r = 0,3k$; k und $k_2 = 1,5k$ (Fall II b), berechnet wurde. Die Punkte liegen eher oberhalb als unterhalb der Kurve, was also ein Beweis dafür ist, dass die 1,4- α -glucosidischen Bindungen des Ringes mit einer Geschwindigkeit gespalten werden, die wahrscheinlich kleiner als $0,3k$ ist, wobei k die Spaltungsgeschwindigkeit einer chemisch identischen Bindung in einem langen Saccharidmolekül mit offener Kette ist. Dieser grosse Unterschied in der Spaltungsgeschwindigkeit ist nicht leicht zu verstehen. Der Ring des β -Dextrins ist nach FREUDENBERG spannungsfrei; nur haben, wie schon erwähnt, die Glucosidbrücken darin eine ganz bestimmte Lage im Verhältnis zu den Glucoseresen, während in den Sacchariden mit offenen

* Die Bestimmung von $2c_2$ sollte durch Gärversuche mit *Saccharomyces uvarum* (Glucose + Maltose) und *S. marxianus* (Glucose) möglich sein. Die *S. uvarum* die uns zugänglich war, hat aber Maltose so langsam vergoren, dass eine Maltosebestimmung nicht möglich war.

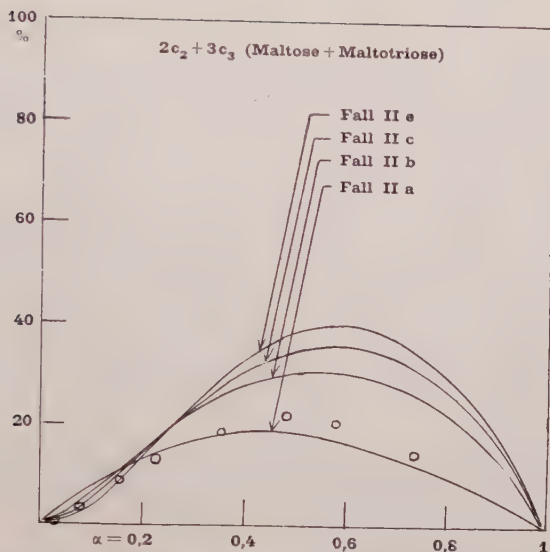


Abb. 2. Ausbeute an Maltose + Maltotriose bei verschiedenen Hydrolysegraden.

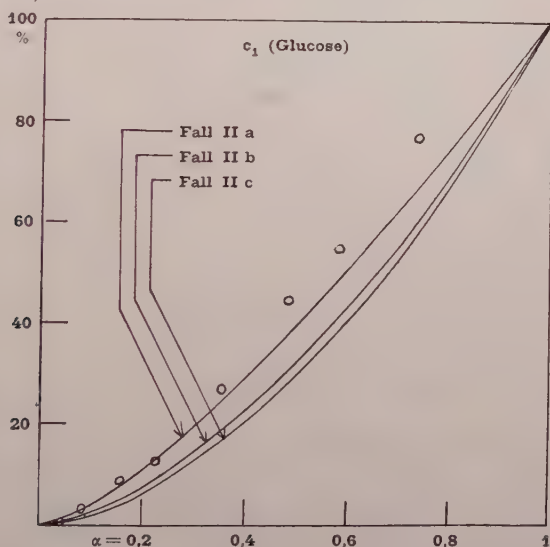


Abb. 3. Ausbeute an Glucose bei verschiedenen Hydrolysegraden.

Ketten die freie Drehbarkeit um die C—O-Bindungen alle möglichen Lagen der Glucosereste im Verhältnis zu einander ermöglicht. Wir müssen annehmen, dass im ringförmigen Dextrin die besondere Lage der Glucosereste zu einander eine Art sterischer Hinderung bedingt: Die Glucosidbindungen sind vor dem Angriff der H^+ -ionen irgendwie geschützt.

Aus der Abbildung 2 ist ersichtlich, dass die gefundene Ausbeute an Maltose

+ Maltotriose ein Maximum bei etwa 22 % hat. Wenn auch die experimentell gewonnenen Zahlen keine grosse Genauigkeit besitzen, so ist ganz deutlich, dass sie weit unter denen liegen, die unter der Annahme berechnet werden, dass $k_r = k$ ist. Sie liegen aber auch wesentlich niedriger als die unter der Annahme von $k_r = 0,3k$ berechneten, tatsächlich fast so niedrig wie die Kurve, die für $k_r = 0,1k$ berechnet werden kann.

In der Abbildung 3 ist die Glucoseausbeute (c_1) gegen den Hydrolysegrad α aufgetragen. Die in den Versuchen gefundenen Ausbeuten liegen offenbar, besonders bei höheren Hydrolysegraden, sogar höher als für den Fall berechnet wird, dass $k_r = 0,1k$ ist. Da also die Ausbeute an c_1 zu hoch und die an Maltose + Maltotriose ($2c_2 + 3c_3$) zu niedrig ist, so liegt es nahe zu fragen, ob nicht etwa in den Sacchariden *beide* terminale Bindungen mit einer Geschwindigkeit gesprengt werden, die grösser als k ist.

V. Beide terminale Bindungen zerfallen mit der Geschwindigkeit $1,5k$, während $k_r = 0,3k$ ist

1) Die Differentialgleichungen sind

$$\frac{dc_{6R}}{dt} = -1,8k c_{6R}$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 1,8k c_{6R} - 6kc_6$$

usw.

2) Die Integration ergibt

$$c_{6R} = x^{1,8}$$

$$c_6 = 0,428\,571\,x^{1,8} - 0,428\,571\,x^6$$

$$c_5 = 0,401\,786\,x^{1,8} + 1,285\,714\,x^6 - 1,687\,5\,x^5$$

$$c_4 = 0,937\,5\,x^{1,8} - 1,5\,x^6 + 5,062\,5\,x^5 - 4,5\,x^4$$

$$c_3 = 3,727\,678\,x^{1,8} + 0,928\,571\,x^6 - 5,906\,25\,x^5 + 13,5\,x^4 - 12,25\,x^3$$

$$c_2 = -49,062\,496\,x^{1,8} - 0,333\,333\,x^6 + 3,133\,929\,x^5 -$$

$$-12,6\,x^4 + 24,5\,x^3 + 34,361\,901\,x^{1,5}$$

$$c_1 = 72,611\,602\,x^{1,8} + 0,023\,810\,x^6 - 0,361\,607\,x^5 + 2,7\,x^4 -$$

$$-12,25\,x^3 - 68,723\,802\,x^{1,5} + 6.$$

3) Der Hydrolysegrad

$$\alpha = 4,840\,773\,x^{1,8} - 0,003\,968\,x^6 + 0,040\,179\,x^5 - 0,15\,x^4 - 5,726\,984\,x^{1,5} + 1.$$

Die für verschiedene Werte von x berechneten prozentischen Werte der Ausbeuten von Glucose, Maltose + Maltotriose, Hexasaccharid, bzw. unverändertem β -Dextrin sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3.

x	α	c_1	$2 c_2 + 3 c_3$	$6 c_6$	$6 c_{16}$
0,1	0,8956	82,76	13,48	0,68	1,58
0,2	0,7547	62,78	24,46	2,36	5,52
0,4	0,4781	30,84	29,07	8,06	19,22
0,6	0,2519	11,44	18,69	15,09	39,87
0,8	0,0923	2,30	5,59	17,45	66,92
0,9	0,0380	0,52	1,45	12,68	82,72

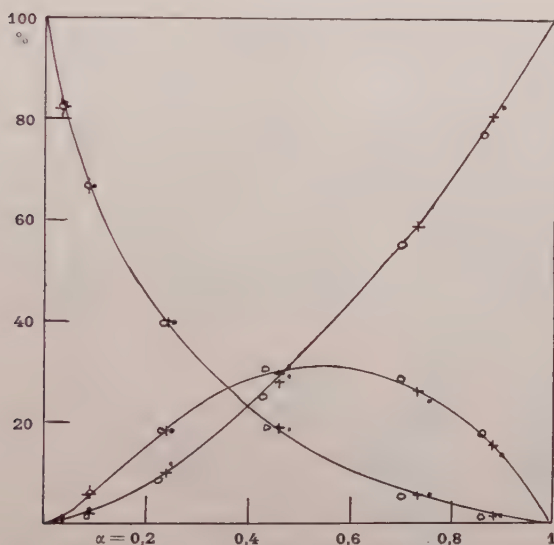


Abb 4. Ausbeuten an Schardingerdextrin, Maltose + Maltotriose, Glucose bei verschiedenen Hydrolysegraden.

- + Fall II b.
- Fall V.
- Fall VI.

Vergleicht man die Werte der Tabelle 3 mit den entsprechenden der Tabelle 2 b, so findet man, dass die Unterschiede nur klein sind. Die Werte von $6 c_{6R}$ sind selbstverständlich in beiden Fällen identisch, wenn man sie als Funktionen von x betrachtet. Betrachtet man sie dagegen (wie in den Abbildungen 1—3) als Funktionen von α , so ist ein kleiner Unterschied vorhanden. Die Werte der Ausbeuten von Glucose einerseits und von Maltose + Maltotriose andererseits, sind, wenn man sie als Funktionen von x betrachtet, etwas verschieden. Die Unterschiede sind im allgemeinen nicht grösser als 2 %. Noch kleiner werden sie wenn man sie auf übereinstimmende Werte von α umrechnet. (Abb. 4.) Die Unterschiede sind dann so klein, dass sie innerhalb der Versuchsfehler der Gärversuche liegen. Die Zusammensetzung der Hydrolysate wird also vor allem dadurch beeinflusst, dass k_r wesentlich kleiner als k ist.

VI. Berechnung für den Fall dass $k_1 = 0,3 k$ ist, und dass die Maltose allein die Zerfallskonstante $k_2 = 1,5 k$ hat

Es wird also angenommen dass sämtliche Bindungen in $c_3 - c_6$ mit der Geschwindigkeitskonstante k zerfallen.

1) Die Differentialgleichungen sind

$$\frac{dc_{6R}}{dt} = -1,8 k c_{6R}$$

$$\frac{dc_6}{dt} = 1,8 k c_{6R} - 5 k c_6$$

.....

$$\frac{dc_1}{dt} = 2 k (c_6 + c_5 + c_4 + c_3) + 3 k c_2$$

2) Die Integration ergibt

$$c_{6R} = x^{1,8}$$

$$c_6 = 0,5625 (x^{1,8} - x^5)$$

$$c_5 = 0,511\,364 x^{1,8} + 1,125 x^5 - 1,636\,364 x^4$$

$$c_4 = 1,789\,773 x^{1,8} - 0,5625 x^5 + 3,272\,727 x^4 - 4,5 x^3$$

$$c_3 = 28,636\,364 x^{1,8} - 1,636\,364 x^4 + 9 x^3 - 36 x^2$$

$$c_2 = -210 x^{1,8} - 6 x^3 + 144 x^2 + 72 x^{1,5}$$

$$c_1 = 315 x^{1,8} + 3 x^3 - 180 x^2 - 144 x^{1,5} + 6$$

3) Der Hydrolysegrad

$$\alpha = 22,75 x^{1,8} + 0,25 x^3 - 12 x^2 - 12 x^{1,5} + 1$$

Die für verschiedene Werte von x berechneten Ausbeuten sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4.

x	α	c_1	$2 c_2 + 3 c_3$	$6 c_6$	$6 c_{6R}$
0,1	0,8614	77,36	17,88	0,89	1,58
0,2	0,7042	55,48	29,23	3,09	5,52
0,4	0,4325	25,04	30,90	10,23	19,22
0,6	0,2278	8,66	18,67	18,05	39,87
0,8	0,0857	1,58	5,58	19,21	66,92
0,9	0,0364	0,34	1,46	13,32	82,72

Vergleicht man diese Werte mit den entsprechenden der Tabellen 2 b und 3, so ist ersichtlich, dass die Unterschiede nur klein sind. Die Verhältnisse gehen am besten aus der Abbildung 4 hervor, in welcher c_1 , $2c_2 + 3c_3$ und $6c_{6R}$ als Funktionen von α dargestellt sind. Offenbar bedingen die denkbaren Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit der verschiedenen Bindungen der Saccharide mit offenen Ketten nur geringfügige Unterschiede in der Zusammensetzung der Hydrolyseprodukte der Schardingerdextrine, die also dadurch im grossen und ganzen bestimmt zu sein scheinen, dass k_r wesentlich kleiner als k ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der sauren Hydrolyse der ringförmig gebauten Schardingerdextrine entstehen zunächst durch Ringsprengung Saccharide mit offenen Ketten, die dann weiter zerlegt werden. Obgleich sämtliche Glucosidbindungen an sich identisch sind, ist ihre Hydrolysegeschwindigkeit sehr verschieden, je nachdem sie in ringförmigen Dextrinen oder in Sacchariden mit offenen Ketten vorkommen. In den Sacchariden mit offenen Ketten ist die durchschnittliche Hydrolysegeschwindigkeit ausserdem von der Kettenlänge der Saccharide abhängig. Der Verlauf der Hydrolyse und die Ausbeuten an verschiedenen Hydrolyseprodukten werden unter Annahme einiger verschiedener Werte von den drei Hydrolysekonstanten durchgeführt. Die Hydrolysegeschwindigkeit der einzelnen Bindung im ringförmigen Dextrin ist höchstens gleich $0,3k$, wenn k die Geschwindigkeit der Hydrolyse einer α -glykosidischen 1,4-Bindung in einem Saccharid mit langer, offener Kette ist.

LITERATUR. (1) **Freudenberg, K.** und Mitarbeiter, *Angew. Chemie* 47, 675 (1934); *Ann.* 518, 102 (1935). *Ber. dtsch. chem. Ges.* 68, 2070 (1935); 69, 1258, 2041 (1936); 71, 1596 (1938); 73, 609 (1940); *Ann.* 558, 1 (1947). — (2) **Kratky, O.** und **Schneidmesser, S.**, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 71, 1413 (1938). — (3) **French, D.** und **Rundle, R. E.**, *J. am. chem. soc.* 64, 1651 (1942). — (4) **Swanson, M.** und **Cori, C. F.**, *J. biol. chem.* 172, 797 (1948). — (5) **Myrbäck, K.** und **Järnström, T.**, *Diese Zeitschrift* 1, Nr 16 (1948). — (6) **Myrbäck, K.**, **Örtenblad, B.** und **Ahlborg, K.**, *Biochem. Z.* 307, 53 (1940).

Tryckt den 24 maj 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



A micromethod for the microbiological determination of amino acids

By GUNNAR ÅGREN

With 3 figures in the text

A micromethod for the determination of amino acids in blood filtrates, certain tissue extracts and other material available only in small quantities would be of great value. HIER and BERGEIM (1) used 16 ml of human plasma from 40-50 ml of blood for the analysis of ten amino acids in tungstic acid filtrates. The total volume per tube was 2 ml. By diminishing the total volume of the medium to a tenth of this amount it seemed probable that a determination of the 18 amino acids, which are analyzed by microbiological methods, could be carried out on 4 ml plasma from about 10 ml of blood. A micromethod for the determination of riboflavin working with this total volume, 0.2 ml, was used by LOWRY and BESSEY (2). However, 10 ml of blood when repeatedly drawn from the organism may be a serious draw-back especially when working with small animals. Accordingly, it was decided to try a further diminishing of the total volume of the medium to 0.045 ml.

Experimental

The general procedure and the preparation of inocula were those previously described (ÅGREN (3)). The microorganisms tested were *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (8014), *Lactobacillus casei* (7469), *Streptococcus faecalis* R (8043), *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (8042), *Lactobacillus fermenti* 36 (9338) and *Leuconostoc citrovorum* (8081). The medium of HENDERSON and SNELL (4)¹ was used for all amino acid assays with the exception of alanine and glycine which were carried out on the medium of DUNN et al. (5). In the amino acid determinations with *Lactobacillus casei* better results were sometimes obtained when this microorganism was grown in a weaker medium (W. M.) containing 0.5 times the concentration of all ingredients of the HENDERSON and SNELL medium with the exception of Salt C which was kept at the original concentration (cf. ÅGREN (3)). The amino acids were from Merck. DL-forms of alanine, aspartic acid, isoleucine, methionine, phenylalanine, serine, threonine and valine were employed. The natural isomers of the others were used.

¹ I wish to express my appreciation to these authors for obtaining the composition of their basal medium prior to its publication.

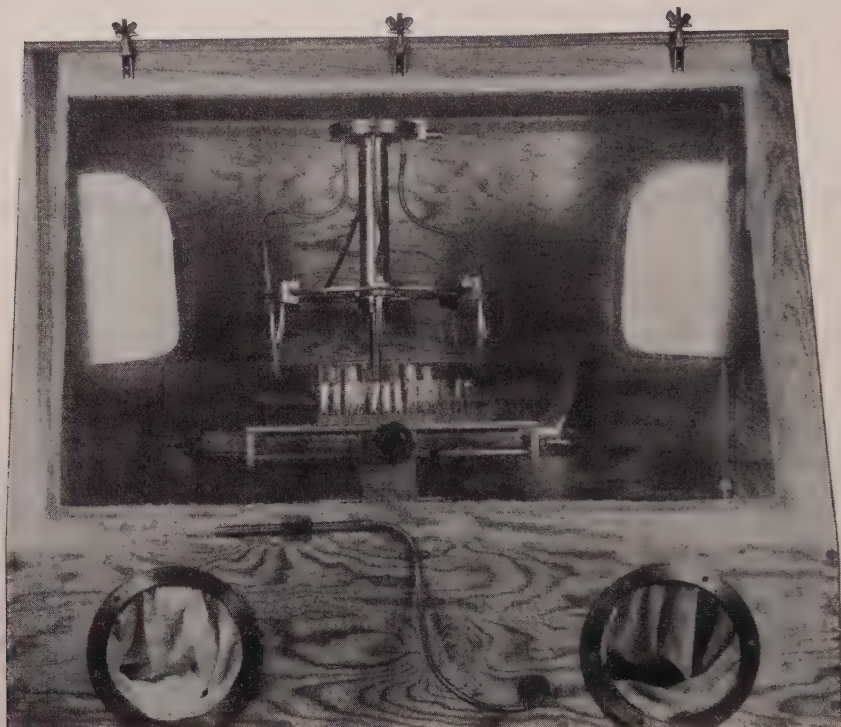


Fig. 1. Cabinet with arrangements for sterile micro-pipettation.

Much of the assay equipment was the same as used by LINDERSTRÖM-LANG and HOLTER (6) for enzyme determinations. Lipless 5×25 mm culture tubes were held in racks 3.5×16.5 cm made from oak and brass pins, each with a capacity of 26 tubes. Fresh sterile solutions of complete basal medium, incomplete basal medium, 4 to 5 dilutions of the standard, the samples and sterile water (for washing of pipettes) were kept in 10×55 mm tubes held in racks, 4.5×12 cm, each with a capacity of 12 tubes. A brass cover could be placed over each rack of 12 tubes. A rack filled with sterile assay tubes and the rack with the solutions were placed on a stage in a cabinet as shown in Figure 1. The wooden cabinet $50 \times 72 \times 60$ cm was furnished with a window, two openings with plastic sleeves, a germicidal lamp in the back-ground and two usual screened lamps. On a central support stand sterile micropipettes could be fixed in a movable brass ring. When a pipette was moved into position over an assay tube on the stage the sterile rubber tube going from the pipette and furnished with sterile cotton was connected with the rubber tube seen on the front of the cabinet. The stage was movable in three directions with micrometer screws.

With this arrangement aseptical filling and emptying of the micropipettes was carried out in the following way. One sterile rack with 26 sterile assay tubes was placed on the stage in front of the rack with the inoculated basal

mediums, the sterile standards and samples, and the metal cover was placed over the latter rack to protect the inoculated medium during the sterilization. Other racks and sterile assay tubes were placed on the bottom of the cabinets. The germicidal lamp was burned for 15 minutes. The metal cover was removed from the rack with the sterile solutions and 5 μ l of standard, 15 μ l of water and 25 μ l of the double strength inoculated medium were added to all tubes. The tubes were then closed with aluminium caps and incubated at 37° for 48 hours in large desiccators with moist cotton. The inoculated basal medium was prepared by aseptical addition of 0.2 ml of inoculum to 1.8 ml of the double strength basal medium. Stirring of the inoculated medium in the cabinet was accomplished by a stream of sterile carbon dioxide-free air. The cells of inocula were suspended in a volume of sterile 0.9 per cent sodium chloride solution 1 to 3 times greater than the volume of the medium in which they were grown. In special assays with several amino acids it was shown that the shapes, slopes and maxima of the standard curves were the same when the tubes were made of Jena glass or soft glass and when cotton plugs or aluminium caps were used.

First it was tried to proceed in the same manner as in the macromethod but it was found that during the autoclavation for 5 minutes at 15 pounds pressure irregular evaporations of water from the medium in the small tubes occurred in such a way that this procedure could not be used. The saturation of the atmosphere in the desiccators with water was found necessary to keep the volume of medium in the assay tubes constant during the incubation period. After incubation the lactic acid produced was titrated directly in the assay tubes with 0.1 N $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$. The titration technique described by LINDERSTRÖM-LANG et al. (6) (7) was employed and brom-thymol blue was used as indicator. 50 μ l of a solution containing 8 mg of indicator per 100 ml of 50 per cent ethanol were added per tube.

Results

Standard curves obtained with the different amino acids tested on the medium of HENDERSON and SNELL are given in Fig. 2 and 3. To facilitate a comparison with the standard curves in the macroprocedure (3) the titration values are given as μ l of 0.05 N $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$. The reduction factor when going from the macromethod to the microprocedure is about 0.01. The standard curves obtained for arginine and cystine were of the same types as in the macroprocedure. With regard to the glutamic acid curves it may be mentioned that the induction period observed in the macroprocedure was not a regular phenomenon in the microprocedure when the pH of the medium was adjusted to 6.8 but more consistent results were obtained when the assays were carried out at pH 6.0. The histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine and phenylalanine curves were of the same types as in the macroprocedure.

An induction period was also observed in both standard and samples with the proline determinations (cf. 4). Compared with the macroprocedure this lag was more pronounced in the micromethod and was corrected by adjusting the pH of the medium to 6.0. As in the macroprocedure the serine assays were carried out with threonine excluded from the medium (8). The remaining amino acids gave assay curves which fairly well corresponded to those obtained in the macroprocedure.

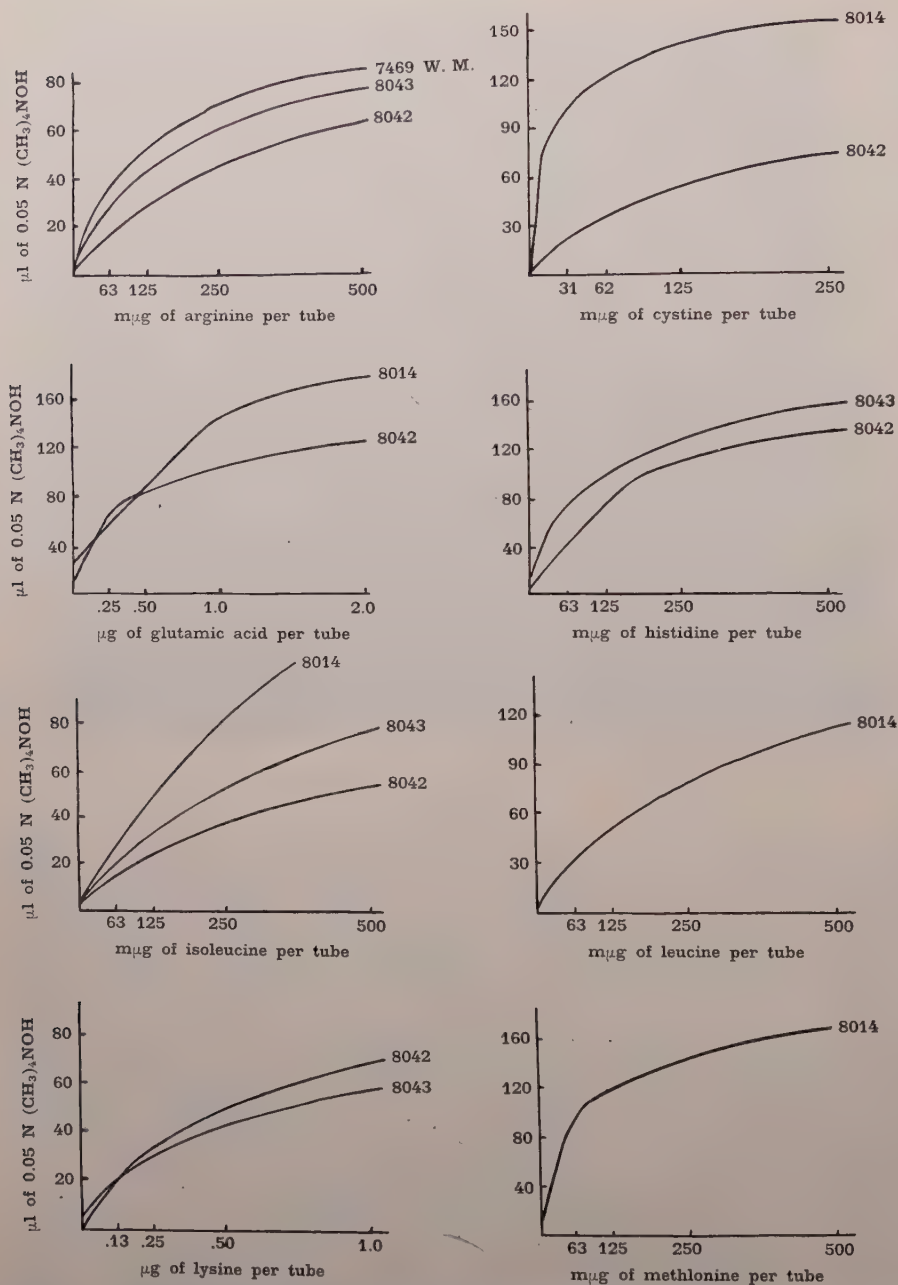


Figure 2. Standard curves on the medium of HENDERSON and SNELL. The American Type Culture Collection number is used to denote each microorganism.

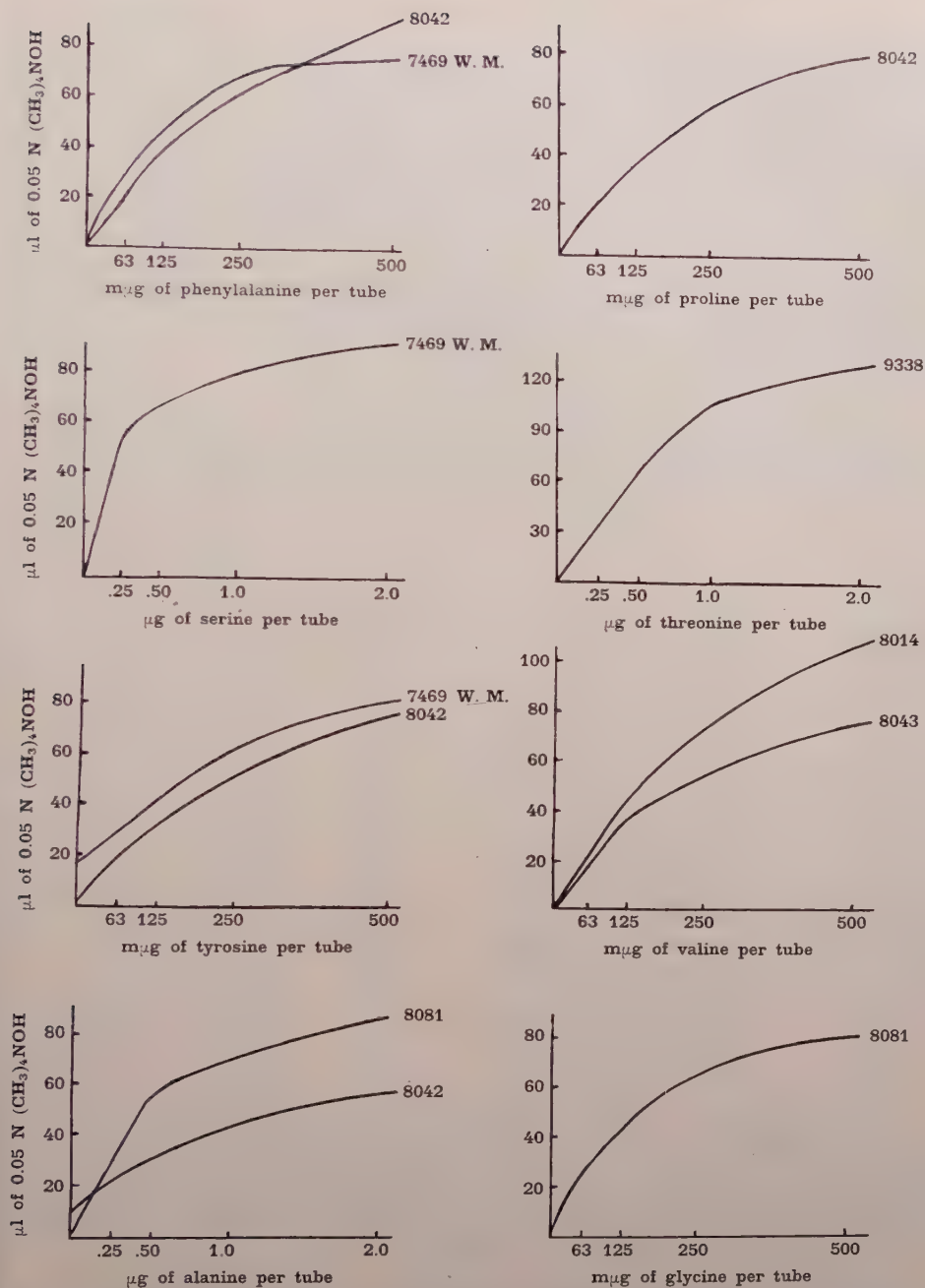


Figure 3. Standard curves on the medium of HENDERSON and SNELL. The alanine and glycine curves on the medium of DUNN et al. The American Type Culture Collection number is used to denote each microorganism.

Analysis of a casein hydrolysate. A »vitamin free» casein (Kärnbolaget Ltd., Stockholm) was hydrolyzed with a mixture of hydrochloric and formic acids for 72 hours under reflux (9) and the surplus of acids removed by concentration in vacuum. Each amino acid determination was made with three tubes at 5 levels both of amino acids standard and of sample. The results of these analyses are shown in Table 1 and are compared with the range of values found by HENDERSON and SNELL (4) with microbiological assays on the same protein. The values calculated from various assay levels agreed fairly well. In view of the small number of analyses made the results must be considered as preliminary but showed a good agreement with the previously reported microbiological values. Compared with data obtained by chemical methods (10) the alanine and cystine values were satisfactory.

Table 1.

Amino acid composition of casein as obtained with the micro method.

Amino acid	Microorganism	Casein		
		Gm per 100 gm ¹	Literature ² values	Literature values
Alanine	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	2.0		2.3 ⁴
Arginine	<i>Lactobacillus casei</i>	3.3		
Arginine	<i>Streptococcus faecalis</i>	3.4	3.8 ± 0.65	3.8 ± 0.4 ³
Arginine	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4.1		
Aspartic acid	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6.8	7.4 ± 0.03	6.9 ± 0.8 ³
Cystine	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	0.4		0.4 ⁴
Glutamic acid	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	20.9	21.7 ± 1.7	21.6 ± 0.8 ³
Histidine	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.9	3.03 ± 0.24	3.06 ± 1.0 ³
Histidine	<i>Streptococcus faecalis</i>	3.0	2.82 ± 0.1	2.8 ⁴
Isoleucine	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7.0	7.6 ± 0.35	6.4 ± 1.6 ³
Leucine	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	9.9	10.25 ± 0.3	9.6 ± 2.4 ³
Lysine	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7.6	8.07 ± 0.3	7.8 ± 1.1 ³
Methionine	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	3.2	2.69 ± 0.26	2.85 ± 0.21 ³
Phenylalanine	<i>Lactobacillus casei</i>	5.9		
Phenylalanine	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3.5		
Proline	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	12.2	11.6 ± 0.7	11.2 ³
Serine	<i>Lactobacillus casei</i>	5.6		
Threonine	<i>Lactobacillus fermenti</i>	4.2	4.28 ± 0.28	4.2 ± 0.4 ³
Tyrosine	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5.7	6.2 ± 0.7	5.8 ± 0.7 ³
Valine	<i>Streptococcus faecalis</i>	7.8	7.15 ± 0.4	6.67 ± 1.1 ³

When enzymatical analyses are carried out with the equipment used in the present investigation total volumes of 10 to 15 µl are employed and it seems probable that the microbiological determinations may be carried out with the same final volume. Most of the experimental part of the present investigation was finished when the micromethod of HENDERSON, BRICKSON and SNELL (11) with a final volume of 200 µl was published.

¹ All values are expressed as gm of amino acid per 100 gm of dried ash-free protein.

² Values found by HENDERSON and SNELL (4).

³ Values quoted by HENDERSON and SNELL. In both columns the variation indicates the extreme values found.

⁴ Quoted by WILLIAMSON (10).

SUMMARY

A micro adaptation of the usual microbiological procedure for the determination of amino acids is described where the total volume of basal medium corresponds to a drop, 45 μ l. Assays of 16 amino acids in a casein hydrolysate indicates that values can be obtained which agree with those obtained in macroprocedures.

Parts of the expenses for this investigation were defrayed by a grant from the Swedish Natural Science Research Council.

The Department of Medical Chemistry, University of Uppsala.

REFERENCES: 1. Hier, S. W., and Bergeim, O., *J. Biol. Chem.*, *163*, 129 (1946). — 2. Lowry, O. H., and Bessey, O. A., *J. Biol. Chem.*, *155*, 71 (1944). — 3. Ågren, G., *Acta Chem. Scand.*, *2*, 797, (1948). — 4. Henderson, L. M., and Snell, E. E., *J. Biol. Chem.*, *172*, 15 (1948). — 5. Dunn, M. S., Shankman, S., Camien, M. N., and Block, H., *J. Biol. Chem.*, *168*, 1 (1947). — 6. Linderström-Lang, K., and Holter, H., *Z. physiol. Chem.*, *201*, 9 (1931). — 7. Linderström-Lang, K., Weil, L., and Holter, H., *Z. physiol. Chem.*, *233*, 174 (1935). — 8. Meincke, W. W., and Holland, B. R., *J. Biol. Chem.*, *173*, 535 (1948). — 9. Miller, G. L., and du Vigneaud, V., *J. Biol. Chem.*, *118*, 101 (1937). — 10. Williamson, M. B., *J. Biol. Chem.*, *156*, 47 (1944). — 11. Henderson, L. M., Brickson, W. L., and Snell, E. E., *J. Biol. Chem.*, *172*, 31 (1948).

Tryckt den 24 maj 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



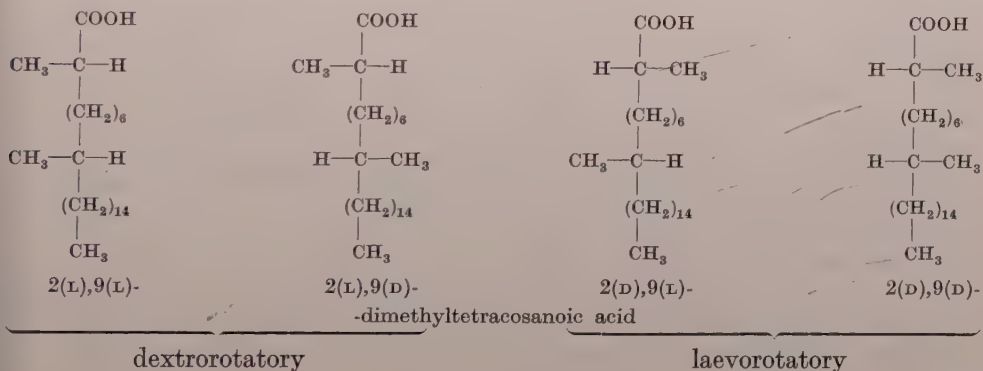
Optically active higher aliphatic compounds. V

Synthesis of the dextrorotatory diastereoisomers of 2,9-dimethyl-tetracosanoic acid

By STINA STÄLLBERG-STENHAGEN

SPIELMAN and ANDERSON (1), and POLGAR and ROBINSON (2), have suggested that phthioic acid, the biologically most important of the branched chain, optically active acids isolated from the tubercle bacillus (human strain H-37), has a structure consisting of a long chain with several methyl side chains. The latter authors suggested that the acid is one of the optically active isomerides of 3,13,19-trimethyltricosanoic acid. However, from optical rotation data now available for synthetic long chain acids carrying a methyl side chain (Parts I-IV (refs. 3-6), and (7)) it is evident, as has already been pointed out by CASON and PROUT (8), that this formula is difficult to reconcile with the high molecular rotation ($[M]_D + 50^\circ$) of phthioic acid. This opinion presupposes that the rules of optical superposition apply, *i. e.* that the optical rotation of an acid with several methyl side chains can be calculated by adding the contributions of the separate active centres, using data obtained from monomethyl substituted acids with the methyl side chain in appropriate positions. Although this appears likely when the active centres are sufficiently far apart, it was desirable to check this through the synthesis of acids having two or more active centres. The physical and biological properties of such acids are also of general interest.

The dextrorotatory isomerides of 2,9-dimethyltetracosanoic acid, which is isomeric with phthioic acid, have therefore been synthesized. The four possible stereoisomeric forms of 2,9-dimethyltetracosanoic acid, written according to the FISCHER convention (9), are shown below.



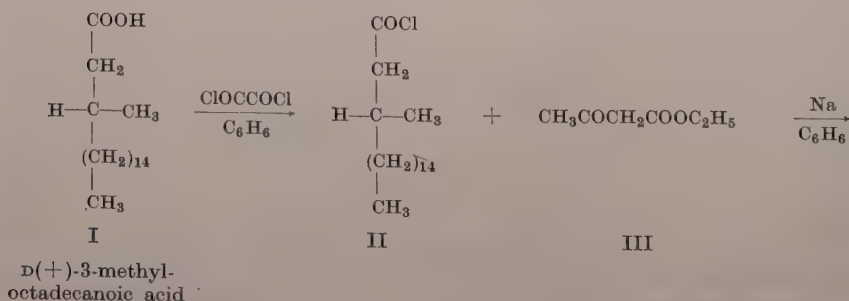
Note on nomenclature. For long chain compounds with more than one active centre it is necessary to indicate the relative configuration of each asymmetric carbon atom. A nomenclature based on the use of trivial names, as that employed for sugars (10), is of course impossible in the present case. It is proposed therefore to indicate the sign of the rotation by (+)- or (-)- preceding the name of the compound, and the relative configuration of each asymmetric centre by a small capital letter D or L placed within brackets immediately after the number indicating the position of the active centre in question.

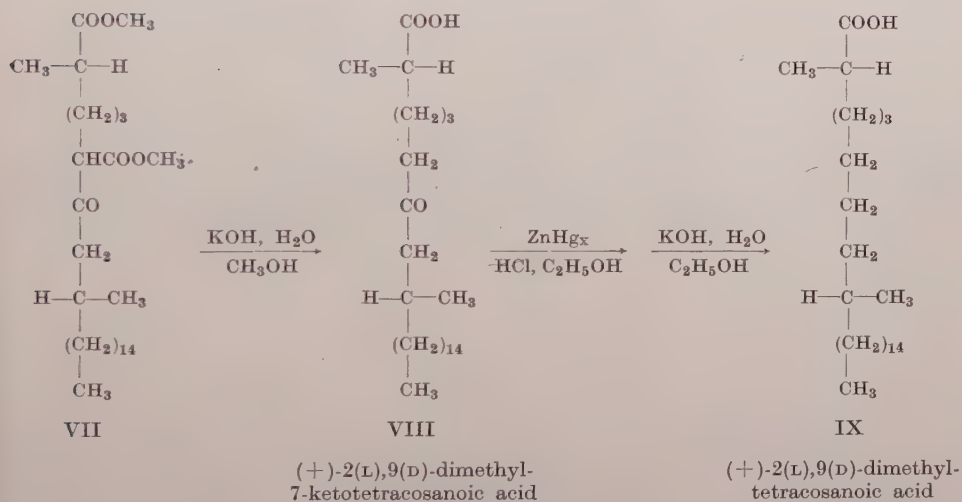
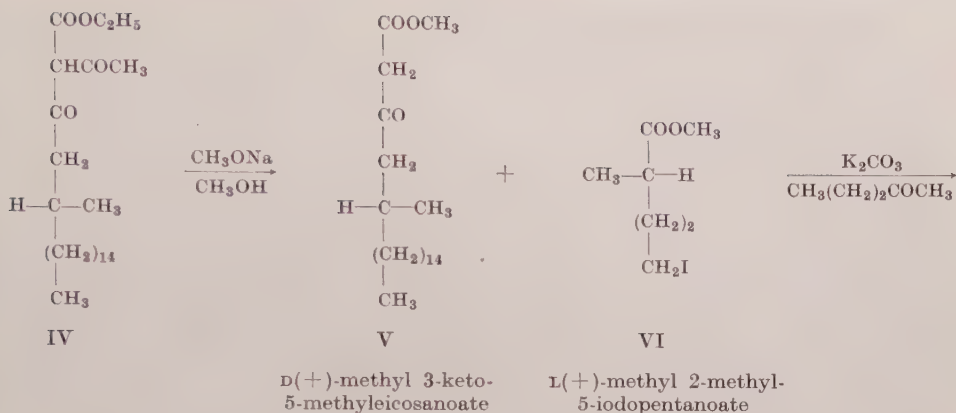
The dextrorotatory forms of 2,9-dimethyltetracosanoic acid shown above, *i. e.* 2(L),9(L)-dimethyltetracosanoic acid and 2(L),9(D)-dimethyltetracosanoic acid, may be prepared in a fairly straightforward manner, using active methylallylacetic acid (Part I (3), cf. also Part IV (6)) and the enantiomorphs of 3-methyloctadecanoic acid as initial material. The latter acids are readily obtainable by the method described in Part II (4).

D(-)-3-Methyl-5-ketoctadecanoic acid, m. p. 50.7–51.1°, $[M]_D^{21} - 4.6^\circ$, was prepared from D(-) (keto form)-methyl 3-keto-5-methylpimelate and *n*-dodecyl iodide. The yield was 50% of the theoretical. Reduction of the keto-acid by CLEMMENSEN's method gave D(+)-3-methyloctadecanoic acid (I) in 70% yield. This acid melts at 44.0–44.1° and has $[M]_D^{20} + 14.5^\circ$. The acid was transformed into D(+)-methyl 3-keto-5-methyleicosanoate (V) by the modified BOUVEAULT-BONGERT-HUNSDIECKER procedure (11). The yield of β -keto ester, m. p. 37.5–37.9°, $[M]_D^{20} + 15.6^\circ$, was 50% of the theoretical. Alkylation of the β -keto ester (V) with L(+)-methyl 2-methyl-5-iodopentanoate was performed in the usual manner (cf. Part I (3)), and the monoalkylation product (VII) gave, after hydrolysis and ketonic cleavage, (+)-2(L),9(D)-dimethyl-7-ketotetracosanoic acid (VIII) in a yield of 40% of the theoretical, calculated on (I). The keto-acid, $[M]_D^{20} + 41^\circ$, can exist in two forms, melting at 39.8–40.0° and 48.5–49.0° respectively.

Reduction of the keto-acid (VIII) by CLEMMENSEN's method gave (+)-2(L),9(D)-dimethyltetracosanoic acid (IX). The reduced was purified via the *amide*, m. p. 87.0–87.3°, $[M]_D^{21} + 25^\circ$. The acid obtained after hydrolysis of the amide melted, after crystallization from methanol, at 21.0–21.4° and had $[M]_D^{20} + 30^\circ$. If the molten acid is kept at a temperature below 24°, a second form slowly crystallizes out. The higher melting form melted at 24.9–25.2°.

Chart





(+)-2(L),9(L)-*Dimethyltetracosanoic acid* was prepared in an analogous manner from L(-)-3-methyloctadecanoic acid, m. p. 43.6–44.0°, $[M]_D^{21} - 14.1^\circ$. The yields in the various steps were very similar to those obtained in the synthesis of the diastereoisomer. (+)-2(L),9(L)-*Dimethyl-7-ketotetracosanoic acid*, $[M]_D^{21} + 18.4^\circ$ has two crystalline forms, with melting points of 51.8–52.5° and 57.5–58.0° respectively. The (+)-2(L),9(L)-*dimethyltetracosanoic acid* had m. p. 34.4–34.7° and $[M]_D^{21} + 30^\circ$. Only one crystalline form has been observed. The acid can be obtained from light petroleum in the form of comparatively large single crystals, which show well-developed faces. (+)-2(L),9(L)-*Dimethyltetracosanamide* melted at 90.6–90.8°.

In the present case it might be expected that the contribution to the optical rotation of the asymmetric centre in position 9 should be very small, and this agrees with the findings above that the molecular rotation of the dextrorotatory diastereoisomers is, within the experimental error, the same and numerically very nearly equal to the molecular rotation ($[\text{M}]_D^{28^\circ}$) of the enantiomorphous 2-methylhexacosanoic acids

described in Part IV (6). In the keto-acids, on the other hand, where the centre in position 9 is separated from the keto-group by one methylene group only, the contribution of this centre is very marked, the molecular rotations of the 2(L),9(D)- and the 2(L),9(L)-keto-acids being $+40.6^\circ$ and $+18.4^\circ$ respectively. The mean of these two molecular rotations is the same, *i. e.* $+30^\circ$, as the molecular rotation of the reduced acids, showing that the positive contribution of the 9-centre in the former case is numerically equal to the negative contribution in the latter case.

Of the four pairs of enantiomorphs prepared in the course of the present work, *i. e.* the 3-methyl-5-ketooctadecanoic acids, 3-methyloctadecanoic acids, 3-methyloctadecanamides, and the methyl esters of 3-keto-5-methyleicosanoic acid, the first three pairs give racemic compounds melting higher than the antipodes. This is not the case for the last mentioned enantiomorphic pair of β -keto esters, and in this case the melting points of a series of binary mixtures have been determined, using the technique described in Part III (5). As described in the experimental part, the antipodes are dimorphic, with forms melting at 38° and 44° respectively. The DL- β -keto ester shows a highly complex polymorphism with at least three different crystalline forms. Only previously melted specimens of the racemic ester showed a sharp m. p., *viz.* $17.4\text{--}17.6^\circ$. It was found that if mixtures containing more than about 7 % of one antipode were melted and rapidly solidified in cold water, melting in every case occurred at the temperature just mentioned, indicating that the form of the DL- β -keto ester melting at $17.4\text{--}17.6^\circ$ is a racemic solid solution. When the ratio between the amounts of antipodes departs from 1 : 1 there is an increasing tendency for the molten mixtures to crystallize in one of the higher melting modifications, and it has not been possible to realize the form melting at $17.4\text{--}17.6^\circ$ for the pure enantiomorphs. The polymorphism made it impossible to construct the melting point diagrams for the higher melting forms.

Experimental¹

L(+)-3-Methyl-5-ketooctadecanoic acid. This acid was prepared by the method described in Part II (4) from L-methyl 3-keto-5-methylpimelate (39.6 g) and *n*-dodecyl iodide (54.3 g, prepared from a pure specimen of *n*-dodecanol-1 by means of iodine and phosphorus), using 70 g of potassium carbonate and 280 ml of methyl-*n*-propyl ketone for the alkylation. After refluxing for 19 hours the reaction mixture was worked up in the usual manner, and the alkylation product subjected to hydrolysis and ketonic cleavage by dissolving in a solution of potassium hydroxide (120 g) in water (120 ml) and methanol (1800 ml). After being kept at a temperature of 50° for 18 hours the solution was acidified and worked up in the usual manner. Crystallization from light petroleum (b. p. $40\text{--}60^\circ$) at -15° gave 29.7 g (52 % of the theoretical) of L(+)-3-methyl-5-ketooctadecanoic acid. The acid appeared visibly dimorphous. After previous melting the m. p. was $50.0\text{--}50.5^\circ$. Two recrystallizations from light petroleum (b. p. $40\text{--}60^\circ$) gave the keto-acid in the form of large elongated plates, m. p. $51.1\text{--}51.3^\circ$. The same m. p. was found for previously melted material. No dimorphism has been observed in the recrystallized specimen. Long X-ray spacing (pressed specimen) $36.9\text{ \AA}$.

¹ Melting points, optical rotations and crystal spacings were determined as described in Part I (3).

Optical rotation	$\alpha_D^{21} + 0.30^\circ$	(chloroform; <i>l</i> , 2; <i>c</i> , 10)
	$[\alpha]_D^{21} + 1.50^\circ$	$[M]_D^{21} + 4.7^\circ$
Anal.: Calcd for $C_{19}H_{36}O_3$	(312.5)	C, 73.03; H, 11.61 %
Found		C, 72.97; H, 11.66 %

D (−)-3-Methyl-5-ketooctadecanoic acid was prepared in 50 % yield from D-methyl 3-keto-5-methylpimelate and *n*-dodecyl iodide, using the procedure just described for the antipode. After crystallization from light petroleum (b. p. 40–60°) the keto-acid melted (after previous melting) at 50.4–50.7°. One further crystallization from the same solvent gave the acid in the form of large lustrous plates, m. p. 50.7–51.1°. The long X-ray spacing of a pressed specimen was 36.8 Å, but the diffraction pattern showed some faint additional lines, indicating the presence of a small amount of a second crystalline modification.

Optical rotation	$\alpha_D^{20} - 0.59^\circ$	(chloroform; <i>l</i> , 4; <i>c</i> , 10)
	$[\alpha]_D^{20} - 1.48^\circ$	$[M]_D^{20} - 4.6^\circ$
Anal.: Calcd for $C_{19}H_{36}O_3$	(312.5)	C, 73.03; H, 11.61 %
Found		C, 73.08; H, 11.62 %

DL-3-Methyl-5-ketooctadecanoic acid was prepared by mixing equal amounts of the antipodes and recrystallizing from light petroleum (b. p. 40–60°). The DL-acid was obtained as small lustrous plates, m. p. 56.2–56.4°. The m. p. was unchanged after previous melting. Long X-ray spacing (pressed or melted specimen) 37.5 Å.

D (+)-3-Methyloctadecanoic acid (I). 13.8 G of D (−)-3-methyl-5-ketooctadecanoic acid was reduced by CLEMMENSEN's method (cf. Part II (4)) in ethanol solution, using 300 g of amalgamated granulated zinc and 300 ml of solvent. Dry hydrogen chloride was led in until the solution became saturated. The mixture was refluxed for 10 hours and hydrogen chloride led in twice during this period. The reaction mixture was worked up and the reduction procedure repeated. The mixture was worked up, and the resulting crude ethyl ester of the reduced acid hydrogenated in ethanol (50 ml) solution, using 0.03 g of platinum oxide catalyst. 60 ml of hydrogen was taken up (room temperature). The ester was hydrolyzed in the usual manner, and the reduced acid crystallized from a small volume of low-boiling (b. p. below 40°) light petroleum. Yield 9.3 g (70 % of the theoretical) of D (+)-3-methyloctadecanoic acid in the form of stout prismatic crystals, m. p. 42.5–43.5°. Crystallization from glacial acetic acid gave the acid in the form of glistening plates, m. p. 42.8–43.8°. The X-ray diffraction pattern from a pressed specimen showed the presence of two crystalline modifications with long spacings of 25.9 and 36.6 Å respectively. Further recrystallization from glacial acetic acid or from light petroleum (b. p. below 40°) gave the acid in the form of thick glistening plates (single crystals). These melted at 44.0–44.1° (unchanged after previous melting), and the X-ray diffraction pattern now showed that only the form with a long spacing of 25.9 Å was present.

Optical rotation	$\alpha_D^{20} + 1.94^\circ$	(chloroform; <i>l</i> , 4; <i>c</i> , 10)
	$[\alpha]_D^{20} + 4.84^\circ$	$[M]_D^{20} + 14.5^\circ$
Anal.: Calcd for $C_{19}H_{38}O_2$	(298.5)	C, 76.45; H, 12.83 %
Found		C, 76.69; H, 12.85 %

D-3-Methyloctadecanamide was prepared via the acid chloride in the usual manner. After two crystallizations from 80% methanol the amide formed fine needles, m. p. 91.4–91.7°. A pressed specimen showed a long X-ray spacing of 26.8 Å. After previous melting the m. p. was 90.0–90.4°, indicating that the amide is dimorphic.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{19}H_{39}ON$ (297.5)	N, 4.71 %
Found	N, 4.66 %

L(–)-3-Methyloctadecanoic acid was prepared by reduction of the dextrorotatory keto-acid in the manner described for the antipode. The reduced acid was obtained in 60% yield. After one crystallization from low-boiling light petroleum and two further crystallizations from glacial acetic acid, *L(–)-3-methyloctadecanoic acid* was obtained in the form of large lustrous plates, m. p. 43.9–44.1°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 25.9 Å.

<i>Optical rotation</i> $\alpha_D^{21} - 0.51^\circ$	(chloroform; <i>l</i> , 1; <i>c</i> , 10.7)
$[\alpha]_D^{21} - 4.75^\circ$	$[M]_D^{21} - 14.1^\circ$

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{18}H_{38}O_2$ (298.5)	C, 76.45; H, 12.83 %
Found	C, 76.71; H, 12.98 %

L-3-Methyloctadecanamide. After two crystallizations from 80% methanol the amide formed fine needles, m. p. 91.6–91.8°. After previous melting the m. p. was 90.1–90.3°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 26.8 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{19}H_{39}ON$ (297.5)	N, 4.71 %
Found	N, 4.71 %

DL-3-Methyloctadecanoic acid was prepared by mixing equal amounts of the enantiomorphs and crystallizing from glacial acetic acid. The DL-acid was obtained as lustrous plates, m. p. 50.7–50.9°. Previously melted material melted at 50.3–50.7°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 26.5 Å.

DL-3-Methyloctadecanamide was prepared from equal amounts of the antipodes. After crystallization from 80% methanol the amide formed small needles, m. p. 93.2–93.5°. After further crystallization from ether the m. p. was 94.0–94.5°. After previous melting the m. p. was 89.1–89.5°. Long X-ray spacing (melted specimen) 35.5 Å. Pressed specimens appeared unfavourably orientated for the production of 00*l* reflexions.

D(+)-Methyl 3-keto-5-methyleicosanoate (V). The β -keto ester was prepared by the modified BOUVEAULT-BONGERT-HUNSDIECKER procedure (14) from *D(+)-3-methyloctadecanoic acid (I)*. The acid chloride (II) was prepared from 7.3 g of the acid, using 3 ml oxalyl chloride and 15 ml of benzene. Ethyl sodioacetoacetate was prepared from 0.65 g of granulated sodium and 3.9 g of ethyl acetoacetate (III) in benzene (50 ml). The acylation product (IV) was decomposed by means of sodium (0.65 g) in methanol (18 ml). After standing for 5 hours the reaction mixture was worked up and the β -keto ester isolated by low temperature (–35°) crystallization from acetone. 6.85 G of crude product, m. p. 33–36°, was obtained. Recrystallization from 99.5% ethanol gave pure *D(+)-methyl 3-keto-5-methyleicosanoate (V)* in the form of lustrous plates, m. p. 37.5–37.9°. The yield of purified β -keto ester was 50% of the theoretical, calculated on (I). Long X-ray spacing

(pressed specimen) 25.4 Å. A melted specimen showed the presence of at least two different crystal forms, a form with a spacing of 28.1 Å predominating.

Optical rotation $\alpha_D^{20} + 0.45^\circ$ (chloroform; *l*, 1; *c*, 10.2)
 $[\alpha]_D^{20} + 4.4^\circ$ $[M]_D^{20} + 15.6^\circ$

Anal.: Calcd for $C_{22}H_{42}O_3$ (354.6) C, 74.52; H, 11.94 %
 Found C, 74.76; H, 11.97 %

L(-)-Methyl 3-keto-5-methyleicosanoate was prepared from laevorotatory 3-methyloctadecanoic acid in a manner analogous to that described for the antipode. The yield of material melting at 36.5–37.5° was 69% of the theoretical. Recrystallization from 95% ethanol raised the m. p. to 37.6–37.9°. In this case previously melted material melted partly at this temperature, but complete melting did not occur until the temperature was raised to 39.4°. The higher melting modification was later obtained in pure form, m. p. 43.8–44.0°, in material that had been slowly cooled. Long X-ray spacing (pressed specimen) 25.4 Å.

Optical rotation $\alpha_D^{20} - 0.43^\circ$ (chloroform; *l*, 1; *c*, 10.2)
 $[\alpha]_D^{20} - 4.2^\circ$ $[M]_D^{20} - 14.9^\circ$

Anal.: Calcd for $C_{22}H_{42}O_3$ (354.6) C, 74.52; H, 11.94 %
 Found C, 74.36; H, 12.02 %

DL-Methyl 3-keto-5-methyleicosanoate was prepared by mixing equal amounts of the antipodes and recrystallizing from acetone at 0°, giving plates melting at 26–31°. The X-ray investigation showed that the specimen was a mixture of two crystalline forms with long spacings of 25.5 and 27.5 Å respectively. A microcrystalline specimen obtained from acetone at –15° appeared to be a mixture of three different forms, a modification with a long spacing of 36.4 Å now predominating. After previous melting the DL-β-keto ester melted at 17.4–17.6°. As mentioned in the introduction, this form is a racemic solid solution.

(+)-2(*L*),9(*D*)-Dimethyl-7-ketotetracosanoic acid (VIII). *D*(+)-Methyl 3-keto-5-methyleicosanoate (5 g) of crude product, m. p. 33–36° was alkylated with *L*(+)-methyl 2-methyl-5-iodopentanoate (3.62 g, cf. Part IV (6)) in the usual manner, using 5 g of potassium carbonate and 22 ml of methyl-*n*-propyl ketone. Refluxing was continued for 16 hours. Hydrolysis and ketonic cleavage was carried out with potassium hydroxide (14 g) in water (14 ml) and methanol (210 ml). After being kept at 50° for 20 hours the reaction mixture was worked up, and the keto-acid crystallized from light petroleum (b. p. 40–60°). 2.95 G (51% of the theoretical) of (+)-2(*L*),9(*D*)-dimethyl-7-ketotetracosanoic acid was obtained. Recrystallization from light petroleum (b. p. below 40°) gave the keto-acid in the form of glistening needles, m. p. 39.8–40.0°. After previous melting a second crystalline form melting at 48.5–49.0° was observed. Long X-ray spacing (pressed specimen) 48.7 Å, calculated from a very beautiful diffraction pattern.

Optical rotation $\alpha_D^{20} + 0.92^\circ$ (chloroform; *l*, 1; *c*, 9.3)
 $[\alpha]_D^{20} + 9.9^\circ$ $[M]_D^{20} + 40.6^\circ$

Anal.: Calcd for $C_{26}H_{50}O_3$ (410.7) C, 76.04; H, 12.27 %
 Found C, 76.00; H, 12.30 %

(+)-2(L),9(L)-*Dimethyl-7-ketotetracosanoic acid*. The acid was prepared in a manner analogous to that described for the isomeride, using L(—)-methyl 3-keto-5-methyleicosanoate (4 g), L(+)-methyl 2-methyl-5-iodopentanoate (3 g), and the same relative amounts of the other reactants in the two steps as in the case of the isomeride. After crystallization from light petroleum (b. p. below 40°) 2.36 g (51% of the theoretical) of (+)-2(L),9(L)-*dimethyl-7-ketotetracosanoic acid*, m. p. 51.8–52.5°, was obtained. A second crystalline form, m. p. 57.5–58.0°, was present in previously melted specimens. The keto-acid crystallized from low-boiling light petroleum in the form of lustrous plates. The melting points recorded above were unchanged on further recrystallization. As in the case of the isomeride pressed specimens gave excellent X-ray diffraction patterns. Long spacing 47.5 Å.

<i>Optical rotation</i>	$\alpha_D^{21} + 1.00^\circ$	(chloroform; <i>l</i> , 2; <i>c</i> , 11.1)
	$[\alpha]_D^{21} + 4.5^\circ$	$[M]_D^{21} + 18.4^\circ$
<i>Anal.</i> : Calcd for C ₂₆ H ₅₀ O ₃	(410.7)	C, 76.04; H, 12.27 %
Found		C, 75.99; H, 12.22 %

(+)-2(L),9(D)-*Dimethyltetracosanamide*. 2.02 G of the keto-acid (VIII) was reduced by CLEMMENSEN'S method in ethanol solution, using the usual procedure. The purification of the reduced acid by direct crystallization proved difficult, and the crude acid was therefore converted into the amide. The acid chloride was prepared by means of oxalyl chloride (2 ml) in benzene (10 ml). The solution was kept at a temperature of 45° for 3 hours. After this time the evolution of gas had ceased. Excess oxalyl chloride and the benzene were distilled off, fresh dry benzene (5 ml) added, and the solution poured into cold (+10°) aqueous ammonia. The amide was taken up in boiling ether. Crystallization from ether gave 1.15 g (yield 59% of the theoretical, calculated on the keto-acid (VIII)) of (+)-2(L),9(D)-*dimethyltetracosanamide* in the form of fine needles forming asbestos-like aggregates. M. p. 87.0–87.3°, unchanged after previous melting. Pressed specimens gave very complex diffraction patterns in which 00*l* reflexions could not be identified.

<i>Optical rotation</i>	$\alpha_D^{21} + 0.72^\circ$	(chloroform; <i>l</i> , 4; <i>c</i> , 2.86)
	$[\alpha]_D^{21} + 6.3^\circ$	$[M]_D^{21} + 24.9^\circ$
<i>Anal.</i> : Calcd for C ₂₆ H ₅₃ ON	(409.7)	N, 3.54 %
Found		N, 3.56 %

(+)-2(L),9(D)-*Dimethyltetracosanoic acid* (IX) was obtained by hydrolysis of the amide just described. The amide (0.55 g) was refluxed with concentrated hydrochloric acid (10 ml) and glacial acetic acid (20 ml). After 18 hours more hydrochloric acid (5 ml) was added, and the refluxing continued for a total of 24 hours. The reaction mixture was diluted with water, and the organic material extracted with ether. The ether solution was washed several times with water and finally dried with sodium sulphate. The residue obtained after removal of the ether was a thick colourless oil. As the smell of acetic acid still persisted, the oil was placed over solid potassium hydroxide in an exsiccator. After all acetic acid had been removed, the residue was solidified and the melting point determined. Most of the solidified material melted at 18.0–18.3°, but a small part melted at 19.8–20.2°.

Attempts to crystallize the acid from a solution in light petroleum or ethanol met with little success, but from methanol at a temperature of -15° (+)-2(L),9(D)-dimethyltetracosanoic acid was obtained in the form of small glistening plates, m. p. $21.0-21.4^{\circ}$. If the liquid was kept at a temperature below 24° it slowly solidified to a mass of exceedingly fine long needles. This crystal form melted at $24.9-25.2^{\circ}$.

Optical rotation	$\alpha_D^{20} + 0.44^{\circ}$	(chloroform; l , 1; c , 5.9)
	$[\alpha]_D^{20} + 7.5^{\circ}$	$[M]_D^{20} + 29.6^{\circ}$
Anal.: Calcd for $C_{26}H_{52}O_2$	(396.7)	C, 78.72; H, 13.21 %
Found		C, 78.65; H, 13.25 %

(-)-2(L),9(L)-Dimethyltetracosanoic acid was prepared by CLEMMENSEN reduction of the corresponding keto-acid, carried out in the usual manner in ethanol solution. After hydrolysis of the ethyl ester formed during the reduction, the reduced acid was crystallized from ethanol at a temperature of -2° . (+)-2(L),9(L)-Dimethyltetracosanoic acid (1.11 g or 60% of the theoretical, calculated on the keto-acid) was obtained in the form of glistening plates, m. p. $34.2-34.6^{\circ}$. After further crystallization from ethanol the m. p. was $34.3-34.8^{\circ}$. Previously melted material melted at $34.4-34.7^{\circ}$. On crystallization from light petroleum (b. p. below 40°) the acid was obtained in the form of well-developed thick plates, showing several faces. Long X-ray spacing (pressed or melted specimen) $47.8 \text{ \AA}$. Both pressed and melted specimens gave beautiful diffraction patterns.

Optical rotation	$\alpha_D^{21} + 0.84^{\circ}$	(chloroform; l , 2; c , 5.55)
	$[\alpha]_D^{21} + 7.6^{\circ}$	$[M]_D^{21} + 30^{\circ}$
Anal.: Calcd for $C_{26}H_{52}O_2$	(396.7)	C, 78.72; H, 13.21 %
Found		C, 78.84; H, 13.18 %

(+)-2(L),9(L)-Dimethyltetracosanamide was prepared via the acid chloride in the manner described for the isomeride. Crystallization from ether gave the amide in the form of felted needles, m. p. $90.6-90.8^{\circ}$. Previously melted material showed the same m. p. Long X-ray spacing (pressed specimen) $47.8 \text{ \AA}$.

Optical rotation	$\alpha_D^{21} + 0.19^{\circ}$	(chloroform; l , 1; c , 2.79)
	$[\alpha]_D^{21} + 6.8^{\circ}$	$[M]_D^{21} + 28^{\circ} (\pm 2^{\circ})$
Anal.: Calcd for $C_{26}H_{53}ON$	(409.7)	N, 3.54 %
Found		N, 3.54 %

The author is indebted to Mr. W. KIRSTEN and Mr. I. ALPEROWICZ for the microanalyses reported in this paper, and to Mr. L. AHLQUIST for assistance in the synthetic work. The cost of the investigation was defrayed by grants from the Swedish National Anti-tuberculosis Association and from the Rockefeller Foundation.

SUMMARY

The synthesis of the two dextrorotatory isomerides of 2,9-dimethyltetracosanoic acid is described. The enantiomorphic 3-methyloctadecanoic acids are synthesized and converted into the enantiomorphic methyl esters of 3-keto-5-methyleicosanoic acid. Alkylation of the β -keto esters with L(+)-methyl 2-methyl-5-iodopentanoate, followed by hydrolysis and ketonic cleavage of the alkylation product, gives two diastereoisomeric keto-acids, which upon reduction by CLEMMENSEN's method yield the diastereoisomeric (+)-2(L),9(D)-dimethyltetracosanoic and (+)-2(L),9(L)-dimethyltetracosanoic acids respectively. The nomenclature of optically active compounds of this type is discussed.

Institute of Medical Chemistry, University of Uppsala.

REFERENCES: 1. Spielman, M. A., and Anderson, R. J., *J. Biol. Chem.* **112**, 759 (1935-36). — 2. Polgar, N., and Robinson, Sir R., *J. Chem. Soc.* **1945**, 389. — 3. Ställberg-Stenhagen, S., *Arkiv för Kemi, Min. o. Geol.* **23 A**, No. 15 (1946). — 4. *Idem, ibid.* **26 A**, No. 1 (1948). — 5. *Idem, ibid.* **26 A**, No. 12 (1948). — *Idem*, *Arkiv för Kemi* **1**, Nr 18 (1949). — 7. Prout, S. F., Cason, J., and Ingersoll, A. W., *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 298 (1948). — 8. Cason, J., and Prout, S. F., *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 879 (1948). — 9. Fischer, E., *Berichte* **24**, 2683 (1891); cf. Freudenberg, K., *Stereochemie*, Leipzig and Vienna 1932, p. 662. — 10. Rosanoff, M. A., *J. Amer. Chem. Soc.* **28**, 114 (1906).

Tryckt den 24 maj 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

On the dimeric dithioderivatives of β -diketones

By ARNE FREDGA and ARNE BRÄNDSTRÖM

In a previous paper an improved method for preparing dimeric dithioderivatives of β -diketones was described (1). Also a new formula was proposed for such compounds, which seems more probable than the old formula set forth by FROMM and ZIERSCH (2). The new structure represents a strainless system of four six-membered rings, analogous to the characteristic ring system of hexamethylene-tetramine, adamantane, and certain inorganic compounds. Starting from the fairly easily available β -diketones, one can obtain such ring systems with substituents or side chains in different positions in the molecule. The physical and chemical properties of such compounds may be of considerable interest.

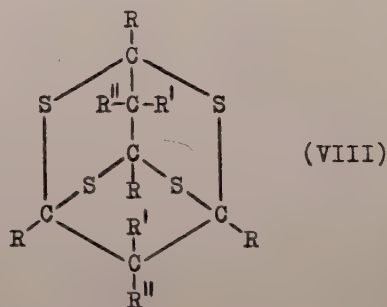
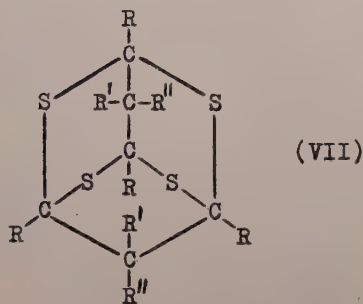
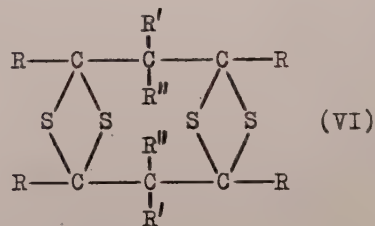
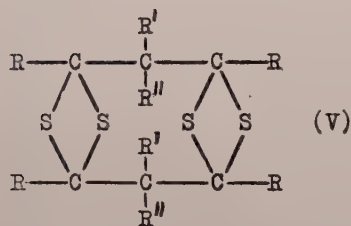
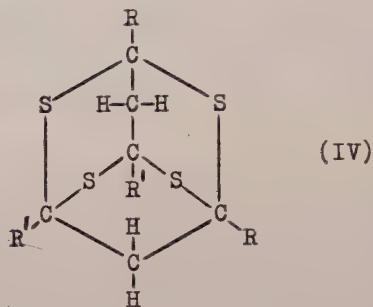
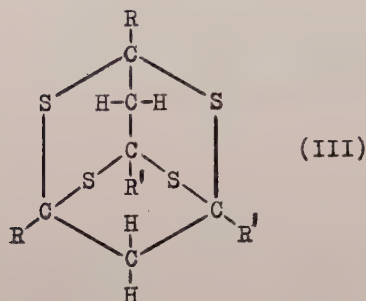
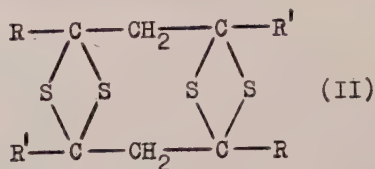
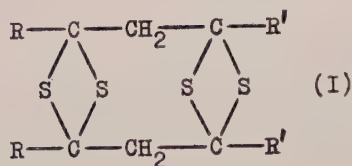
A closer study of the dithioderivatives obtained from certain unsymmetrical diketones might throw light upon the structure question, which cannot be regarded as definitely settled. If the old formula of FROMM and ZIERSCH (2) is accepted, a diketone of the type $R-CO-CH_2-CO-R'$ must give rise to two isomeric sulphur derivatives (I and II), owing to the relative positions of the R and R' groups. The authors' formula permits no structural isomerism, but in this case the molecule does not possess any plane of symmetry. Consequently it must exist in two enantiomorphous forms showing optical activity (III and IV). The shape of these molecules is of course pyramidal (compare hexamethylene-tetramine) and in the figures III, IV, VII, and VIII the central part of the formula, representing the apex of the pyramide, is imagined to lie in front of (above) the plane of the paper.

If the dimeric sulphur derivatives of a diketone of the type $R-CO-CR'R''-CO-R$ are considered, the old formula would give rise to cis-trans-isomerism (V and VI). This possibility has already been pointed out by FROMM and ZIERSCH (2). The new formula does not permit any such isomerism, but also in this case, the molecule must exist in two enantiomorphous, optically active forms (VII and VIII).

With the old structure (I, II, V, and VI), no optical activity is possible.

In addition to the compounds previously described (1), dimeric dithioderivatives of a number of diketones have been prepared. Aliphatic β -diketones react smoothly with hydrogen sulphide under appropriate conditions, yielding crystalline compounds. β -Phenylpropionyl-acetone (hydrocinnamoyl-acetone) also gives a crystallising sulphur compound. Diketones containing a benzene nucleus adjacent to the carbonyl group, *e. g.* benzoylacetone and dibenzoylmethane, have as yet only yielded tar-like products.

In all cases examined to date, only one form of the sulphur derivative was obtained. The yield was in most cases very good and no traces of the isomerides required by the old formula were observed. This is of course a strong argument in favour of the new structure, but conclusive evidence can only be obtained by resolving



one of the compounds into optical antipodes. The substances hitherto examined contain no acidic or basic groups, and it is therefore not possible to resolve them in the ordinary way by salt formation with an optically active base or acid. If a great number of substances are prepared, there is, of course, a certain possibility that one or two of them could be resolved spontaneously on crystallisation from a suitable solvent. The experiments on optical resolution are being pursued.

A dithioderivative of pivaloyl-acetaldehyde, a β -ketoaldehyde (compare I-IV, $\text{R}' = \text{H}$), has also been obtained. In this case, the yield was not very good, a considerable amount of amorphous by-products being formed. This is perhaps a natu-

ral consequence of the absence of one of the alkyl groups; it is well known that such groups often favour a ring closure reaction.

The β -diketones were prepared by condensing methyl alkyl ketones with ethyl esters. As condensing agents either sodium ethylate or sodium amide according to ADAMS and HAUSER (3) have been used. The use of metallic sodium is of no advantage (4). For condensations with sodium ethylate, the common method of using ethyl acetate as a solvent (5), which is obviously disadvantageous, has been modified by the use of ether instead. It has also been found favourable to use a certain excess of ethylate (about two equivalents of sodium ethylate for each mole of ketone). If ethyl acetate had been used as solvent, this excess would have resulted in the formation of a considerable amount of β -keto ester. The diketones obtained were purified through their copper salts according to ADAMS and HAUSER (3).

The sodium ethylate method gives very good yields for ethyl formiate and ethyl acetate. For higher esters, the yields were poor, and in these cases the sodium amide method is to be preferred. An experiment on so-called forced condensation (6) with methyl hexyl ketone, ethyl heptanoate and sodium ethylate gave very unsatisfactory results.

Experimental

As the compounds contained no nitrogen or halogen, the *sulphur* could be determined by acidimetric titration of the sulphuric acid formed in combustion according to GROTE and KREKELER (7, 8). Before the titration, the solution from the absorption vessel was boiled for 10 minutes in order to destroy the hydrogen peroxide and to remove carbon dioxide. The titration was carried out with 0.1-*N* NaOH, using a mixture of one part phenol red and three parts thymol blue as indicator. The colour change at the endpoint (yellow $\rightarrow$ pink) was easily perceptible. It was necessary to make a blank titration with the same quantities of the reagents; the correction (about 0.020 ml of 0.1-*N* NaOH) was subtracted from the value obtained. In some cases, parallel determinations were carried out with the common method (precipitation of barium sulphate). The agreement was very good.

The *copper* in the copper salt of diheptoylmethane was determined according to HIEBER (9).

Dimeric dithio-butrylaceton

Butrylaceton: In a 500 ml three-necked round-bottomed flask, fitted with a mechanical stirrer and mercury seal, a reflux condenser, and a separatory funnel, were placed 250 ml of dry xylene and 23 g (1 mole) of clean sodium. The flask was placed in an oil bath and heated until the sodium had melted. At this point the stirring was commenced and the sodium was broken up into very small globules. The oil bath was removed, but stirring was continued until the sodium had solidified into very fine particles. The xylene was then poured off, the sodium was washed with dry ether and then covered with 250 ml of this solvent. 46 g (1 mole) of absolute alcohol was added slowly and the mixture was refluxed for about six hours until most of the sodium had disappeared. 43 g (0.5 mole) of dry methyl *n*-propyl ketone was added followed by 88 g (1 mole) of absolute ethyl acetate. The mixture was refluxed for two hours and allowed to stand overnight.

The contents of the flask were then poured into a mixture of 300 g of ice and 100 g of concentrated sulphuric acid. The ether layer was separated, the water layer was extracted with ether, and the combined ether portions were washed with 50 ml of

water and then dried with anhydrous sodium sulphate. The ether was distilled from a water bath. The residue was diluted with an equal volume of methanol and then poured into a warm solution of 65 g of copper acetate in 500 ml of water. The mixture was allowed to cool and the copper salt of the diketone was filtered by suction, washed with water and then with petroleum ether. The yield was 48 g (60%).

The diketone was obtained by shaking the copper salt with 200 ml of ether and 500 ml of 10% sulphuric acid in a separatory funnel until the ether layer was colourless. The ether layer was separated, the water layer was extracted with ether, and the combined ether portions were washed with 50 ml of water and then dried with anhydrous sodium sulphate. The ether was distilled and the residue fractionated under reduced pressure. The yield of butyrylacetone, boiling at 65–67°/18 mm, was 35 g (3).

Dimeric dithio-butyrylacetone was obtained in the usual manner (1) by treating a 10% solution of butyrylacetone in concentrated alcoholic hydrochloric acid with an excess of hydrogen sulphide at very low temperature. After removing the excess of hydrogen sulphide the crystalline precipitate was filtered by suction, washed with concentrated hydrochloric acid until the washings ran off colourless, and then with water. The yield of crude product was about 90%. After one recrystallisation from alcohol the compound was pure. M. p. 113° and the yield about 85%. This compound is very similar to the propionylacetone compound (1) forming small, lustrous short-prismatic crystals. Like this compound it is moderately soluble in ligroin, acetic acid, methanol and alcohol, very soluble in acetone, ethyl acetate, carbon tetrachloride, benzene and ether.

17.63 mg; 33.87 mg CO₂, 11.85 mg H₂O. — 19.92 mg; 5.000 ml 0.0997-N NaOH.

C₁₄H₂₄S₄ (320.6) calc. C 52.45 H 7.55 S 40.00

found C 52.43 H 7.52 S 40.12

0.1504, 0.3042, 0.4550 g in 15.3 g benzene: E = 0.082°, 0.167°, 0.247°.

M. W. calc. 320.6 found 308, 306, 310.

Dimeric dithio-dibutyrylmethane

Dibutyrylmethane was prepared in the manner described above from 43 g (0.5 mole) of methyl *n*-propyl ketone, 58 g (0.5 mole) of ethyl *n*-butyrate and one mole of sodium ethoxide. Yield about 10%; b. p. 95–100°/18 mm. Sodium amide would give much better results (3).

Dimeric dithio-dibutyrylmethane: A 10% solution of dibutyrylmethane in concentrated alcoholic hydrochloric acid was treated with hydrogen sulphide in the usual manner (1). The yield of crude product was about 95%, and after recrystallisation from alcohol about 90%. The compound forms colourless lustrous needles with m. p. 136.5°. This compound is less soluble in the ordinary organic solvents than the butyrylacetone compound.

18.24, 18.24 mg; 38.23, 38.24 mg CO₂, 13.55, 13.52 mg H₂O. — 18.42 mg; 3.920 ml 0.0997-N NaOH. — 25.73 mg; 63.74 mg BaSO₄.

C₁₈H₃₂S₄ (376.7) calc. C 57.39 H 8.56 S 34.04

found C 57.20, 57.21 H 8.31, 8.30 S 34.01, 34.02.

0.1582, 0.3228, 0.4813 g in 15.0 g benzene: E = 0.072°, 0.142°, 0.220°.

M. W. calc. 376.7 found 377, 390, 375.

Dimeric dithio-heptoylacetone

Heptoylacetone was prepared in the manner described above from 32 g (0.25 mole) of methyl *n*-hexyl ketone, 44 g (0.5 mole) of ethyl acetate and 0.5 mole of sodium ethoxide, Yield 54%. B. p. 120–125°/14 mm (10).

Dimeric dithio-heptoylacetone: A 10% solution of heptoylacetone in concentrated alcoholic hydrochloric acid was treated with hydrogen sulphide in the usual manner (1). The yield of crude product was practically 100%. The product was dissolved in a small volume of ligroin (b. p. 60–70°) and precipitated by adding cold absolute alcohol. After repeating this procedure once a white crystal powder was obtained. The yield was 95%. M. p. 71°. The solubility of this compound is nearly the same as that of the butyrylacetone compound, but it very often forms supersaturated solutions. For this reason it is rather difficult to carry out ordinary recrystallisations.

19.70, 27.94 mg: 42.83, 60.56 mg CO₂, 15.42, 21.87 mg H₂O. 27.27 mg: 5.423 ml 0.0997-*N* NaOH.

C₂₀H₃₆S₄ (404.7) calc. C 59.35 H 8.97 S 31.69

found C 59.33, 59.15 H 8.76, 8.76 S 31.78

0.1179, 0.2018, 0.3092 g in 15.5 g benzene: E = 0.049°, 0.083°, 0.126°.

M. W. calc. 404.7 found 399, 403, 407.

Dimeric dithio-diheptoylmethane

Diheptoylmethane was prepared by the sodium amide method (3) from 38 g (0.3 mole) of methyl *n*-hexyl ketone and 50 g (0.315 mole) of ethyl heptoate and 0.6 mole of sodium amide. Yield of the crude copper salt 44.5 g (55%).

39 g of the crude copper salt was decomposed with ether and sulphuric acid giving 31 g (90%) of the diketone as a colourless liquid with b. p. 163–165°/9 mm. On cooling it solidified to an ice-like crystalline mass, melting at 7°. This compound seems not to have been described before.

22.33 mg: 61.54 mg CO₂, 23.17 mg H₂O

C₁₅H₂₈O₂ (240.4) calc. C 74.95 H 11.74

found C 75.21 H 11.61

The rest 5.5 g of the crude copper salt was recrystallised from hot methanol. It forms lustrous blue needles with m. p. 114°. This copper salt resembles its lower homologues and has the melting point to be expected.

0.2903 g: 5.325 ml 0.1003-*N* Na₂S₂O₃

C₃₀H₅₄CuO₄ (542.3) Cu calc. 11.72 found 11.70.

Dimeric dithio-diheptoylmethane: A 10% solution of diheptoylmethane in concentrated alcoholic hydrochloric acid was treated with hydrogen sulphide in the usual manner (1). The yield of crude product was about 75%. One recrystallisation from absolute alcohol supplied the pure compound in the form of very small needles with m. p. 92–93°. This compound is more soluble in ligroin, but less soluble in alcohol and methanol than the dibutyrylmethane compound.

20.75 mg: 50.26 mg CO₂, 18.74 mg H₂O. — 37.03 mg: 5.445 ml 0.0997-N NaOH. — 32.73 mg: 56.23 mg BaSO₄.

C₃₀H₅₆S₄ (545.0) calc. C 66.11 H 10.36 S 23.53
found C 66.10 H 10.11 S 23.50, 23.60.

0.1492, 0.2958, 0.4441 g in 15.2 g benzene: E = 0.045°, 0.093°, 0.141°.

M. W. calc. 545.0 found 561, 538, 532.

Dimeric dithio- β -phenylpropionyl-acetone

β -Phenylpropionyl-acetone was prepared by the sodium amide method (3) from 0.3 mole of ethyl β -phenylpropionate, 0.6 mole of acetone and 0.6 mole of sodium amide. Yield 45%. B. p. 155–160°/10 mm (11).

Dimeric dithio- β -phenylpropionyl-acetone: A 20% solution of β -phenylpropionyl-acetone in concentrated alcoholic hydrochloric acid was treated with hydrogen sulphide in the usual manner (1). Yield of a slightly coloured product about 90%. The product was decolourised with carbon first in ligroin (b. p. 60–70°) then in methanol, and finally recrystallised from ligroin (b. p. 60–70°). The pure product, with m. p. 110–110.5°, was obtained as a hard crystalline mass. Yield about 75%. The solubility of this compound is nearly the same as that of the heptoylacetone compound. It yields however supersaturated solutions even more readily than the latter compound.

26.20 mg: 62.24 mg CO₂, 14.74 mg H₂O. — 27.06 mg: 56.30 mg BaSO₄.

C₂₄H₂₈S₄ (444.7) calc. C 64.82 H 6.35 S 28.84
found C 64.83 H 6.30 S 28.58

0.1513, 0.3038, 0.4545 g in 15.3 g benzene: E = 0.059°, 0.116°, 0.174°.

M. W. calc. 444.7 found 431, 440, 439.

This compound is very difficult to analyse like most of the dimeric compounds, having very high boiling or eventually decomposition points. Cracking often occurs especially in analysing for sulphur.

Dimeric dithio-pivaloylacetone

Pivaloylacetone was prepared by the sodium amide method (3) from pinacolone, ethyl acetate and sodium amide. Yield 45%. B. p. 55–58°/10 mm.

Dimeric dithio-pivaloylacetone: A 20% solution of pivaloylacetone in concentrated alcoholic hydrochloric acid was treated with hydrogen sulphide in the usual manner (1). The yield of crude product was about 90%. After one recrystallisation the pure compound was obtained with m. p. 164°. Yield 85%. This compound has the same properties as the butyrylacetone compound. Big crystals can however be obtained rather easily.

22.26 mg: 44.99 mg CO₂, 16.19 mg H₂O. — 25.90 mg: 5.963 ml 0.0997-N NaOH.

C₁₆H₂₈S₄ (348.6) calc. C 55.12 H 8.10 S 36.79
found C 55.15 H 8.14 S 36.80

0.0950, 0.2459, 0.3932 g in 15.8 g benzene: E = 0.047°, 0.115°, 0.179°.

M. W. calc. 348.6 found 329, 348, 357.

Dimeric dithio-pivaloyl-acetaldehyde

Pivaloyl-acetaldehyde was prepared by the method described for butyrylacetone from 25 g (0.25 mole) of pinacolone, 37 g (0.5 mole) of ethyl formiate and 0.5 mole of sodium ethoxide. Yield 64%. B. p. 80–83°/75 mm (3).

Dimeric dithio-pivaloyl-acetaldehyde: A 10% solution of pivaloyl-acetaldehyde in concentrated alcoholic hydrochloric acid was treated with hydrogen sulphide in the usual manner (1). A resinous product was obtained. This product was treated with carbon in alcoholic solution, the solution was concentrated and then allowed to cool slowly. Colourless lustrous needles separated, which after one recrystallisation from alcohol were pure with m. p. 176°. Yield about 50%. This compound shows the same solubility conditions as the butyrylacetone compound.

20.53 mg: 39.49 mg CO₂, 13.86 mg H₂O. — 17.80 mg: 4.454 ml 0.0997-*N* NaOH. — 18.91 mg: 55.06 mg BaSO₄.

C₁₄H₂₄S₄ (320.6) calc. C 52.45 H 7.55 S 40.00

found C 52.49 H 7.56 S 39.99, 39.99

0.1378, 0.2544, 0.3976 g in 15.1 g benzene: E = 0.075°, 0.137°, 0.216°.

M. W. calc. 320.6 found 313, 316, 313.

The expenses involved in this research have been defrayed by a grant from the Nobel Fund of the Royal Swedish Academy of Science (Kemiska prisgruppens särskilda fond).

SUMMARY

A number of β-diketones have been treated with hydrogen sulphide and hydrogen chloride at very low temperature as described in a previous paper (1). Characteristic dimeric dithioderivatives were obtained from butyrylacetone, dibutyrylmethane, heptoylacetone, diheptoylmethane, pivaloylacetone, and β-phenylpropionyl-acetone. An analogous compound was obtained from pivaloyl-acetaldehyde. Benzoylacetone and dibenzoylmethane gave only tar-like products. The structure of the sulphur compounds has been discussed and the investigation will be continued.

A modified method for the preparation of certain β-diketones is described.

Department of Organic Chemistry, Chemical Institute, University of Uppsala, January 1949.

REFERENCES. 1. A. Fredgå and A. Brändström, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 26 B N:o 4 (1948). — 2. E. Fromm and P. Ziersch, Ber. 39, 3599 (1906). — 3. J. T. Adams and C. R. Hauser, J. Am. Chem. Soc. 66, 1220 (1944). — R. Levine, J. A. Conroy, J. T. Adams and C. R. Hauser, ibid. 67, 1510 (1945). — 4. J. M. Sprague, L. J. Beckham and H. Adkins, ibid. 56, 2665 (1934). — 5. Org. Syntheses 20, 7 (1940). — 6. C. R. Hauser and B. E. Hudson, Organic Reactions, I, 266 (1942). — 7. W. Grote and H. Krekeler, Z. angew. Chem. 46, 106 (1933). — H. Krekeler, ibid. 50, 337 (1937). — 8. L. Ramberg and B. Bäcklund, Svensk Kem. Tid. 51, 101 (1939). — 9. W. Hieber, Ber. 54, 907 (1921). — 10. C. D. Hurd and C. D. Kelso, J. Am. Chem. Soc. 62, 2187 (1940). — 11. G. T. Morgan and C. R. Porter, Soc. 125, 1273 (1924).

Tryckt den 24 maj 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Proteases in the digestive gland of Lamellibranchs

By BIRGER ROSÉN

The experimental material for this paper was collected some years ago, but other investigations have prevented the author from returning to Kristineberg and from giving the investigation the scope originally intended.

J. J. MANSOUR-BEK (1945, 1946) recently investigated the action of the gastric juice of the Lamellibranchs *Tridacna elongata* Lamk., and *Pinctada vulgaris* L. on proteins. The result was positive, the gastric juice contains protease. The proteolytic action was, however, weak in comparison with that of the gastric juice of *Astacus*, *Maja* and Cephalopoda. YONGE (1935, 1936), however, has denied the occurrence of proteases in the gastric juice of Lamellibranchs.

Almost all my experiments are carried out with extracts from the digestive glands of the marine Lamellibranchs *Mytilus edulis* L., *Ostrea edulis* L. and *Mya arenaria* L., and only a small number of experiments were made with the gastric juice of these animals.

Most of the experiments were carried out with glycerol extracts from ground digestive glands. Glycerol was diluted with water in the proportion 4 : 1, and this diluted glycerol was mixed with the ground mass in the proportion of about 2 ml to 1 gm of digestive gland. After 2 or 3 days the extract was pressed through a piece of linen, and the filtered extract was kept in a refrigerated aquarium after the addition of thymol. Several experiments were carried out with glycerol extracts from digestive glands, previously treated with *acetone and ether*, in the following way: 13 gm digestive glands were crushed in a mortar and stirred up with 65 ml acetone, after one hour a fresh quantity of 65 ml acetone, after one more hour a mixture of 32.5 ml acetone and 32.5 ml ether, after one more hour 65 ml ether, after one more hour a fresh addition of 65 ml ether. The residuum of the digestive glands was dried, pulverized and sifted through finemeshed wire gauze. The extracts were prepared by mixing 1.6 gm of dry powder with 25 ml of glycerol-water (4 : 1) and centrifuging after three days; addition of thymol and the mixture kept in a refrigerated aquarium. To start the experiments, 5 ml of 6 % of gelatine "Delft" were mixed with 2 ml of buffer solution, 1 ml water, in some experiments mixed with a solution of monoiodoacetic acid, and 1 ml enzyme solution, in all 9 ml. Addition of thymol. The experiments were continued for 24 hours at 37° C. The proteolysis was measured by the WILLSTÄTTER's alcohol titration method. The titrations with n/10 KOH in 90 % alcohol were made of 2 ml samples with 18 ml of boiling absolute alcohol added. Titration error ± 0.04 ml. Phenolphthalein was added to the absolute alcohol in the proportion of 0.45 gm per litre. In the acid pH range I used n/10 citrate buffer and in the alkaline n/10 H_3N , H_4NCl . In order to investigate the [H⁺]-optima (nr 26-38), I used m/5 borate buffer.

Table 1

Action of 1 ml extract of digestive glands on 5 ml of 6 % gelatine solution + 2 ml of buffer solution + 1 ml solution of iodoacetic acid or water. Thy-mol. 37° C. 24 hours. Titration on 2 ml samples + 18 ml hot absolute alcohol.

No. of Exp.	Animal	Agent	Added ingredients	pH	Increase in acidity ml n/10 KOH
1	<i>Mytilus edulis</i>	Water extr. of un-ground glands		5.4	0.05
2	Do.	Do.		8.6	0.35
3	Do.	Glycerol extr. of the glands above, ground		5.6	0.60
4	Do.	Do.	5 mg iodoacetic acid	5.6	0.31
5	Do.	Do.		8.2	0.22
6	Do.	Glycerol extr. of glands treated w. acetone-ether		5.5	0.28
7	Do.	Do.	H ₂ S 30 min	5.5	0.46
8	Do.	Do.		8.2	0.24
9	Do.	Do.	5 mg iodoacetic acid	5.5	0.04
10	Do.	+ H ₂ S 30 min Glycerol extract of digestive glands		5.3	0.68
11	Do.	Do.	5 mg iodoacetic acid	5.3	0.29
12	Do.	Do.	7 mg iodoacetic acid	5.3	0.27
13	Do.	Do.	10 mg iodoacetic acid	5.3	0.24
14	Do.	Do.		7.5	0.30
15	<i>Ostrea edulis</i>	Do.		5.4	0.56
16	Do.	Do.	5 mg cysteinhydrochloride	5.5	1.56
17	Do.	Do.	5 mg l-cystein	5.5	0.24
18	Do.	Do.	5 mg iodoacetic acid	5.4	0.22
19	Do.	Do.		7.5	0.40
20	<i>Mya arenaria</i>	Glycerol extract 1 of digestive glands		5.4	1.47
21	Do.	Do.	5 mg iodoacetic acid	5.3	0.67
22	Do.	Do.	10 mg iodoacetic acid	5.4	0.44
23	Do.	Do.		7.3	0.99
24	Do.	Do.		5.5	1.00
25	Do.	19 days old Do.	6 mg cysteinhydrochloride	5.4	2.11
26	Do.	20 days old Glycerol extract 2 of digestive glands		3.5	0.42
27	Do.	Do.		4.5	0.70
28	Do.	Do.		5.0	1.50
29	Do.	Do.		5.1	0.88
30	Do.	Do.		6.1	0.75
31	Do.	Do.		6.5	0.73
32	Do.	Do.		7.1	0.78
33	Do.	Do.		7.5	0.77
34	Do.	Do.		7.6	0.78
35	Do.	Do.		7.7	0.75
36	Do.	Do.		7.9	0.67
37	Do.	Do.		7.9	0.62
38	Do.	Do.		8.1	0.48

Table 1 (cont.).

No. of Exp.	Animal	Agent	Added ingredients	pH	Increase in acidity ml n/10 KOH
39	<i>Mya arenaria</i>	Glycerol extr. of glands treated w. acetone-ether		5.2	0.49
40	Do.	Do.	10 mg cysteinhydrochloride	5.3	1.04
41	Do.	Do.	15 mg cysteinhydrochloride	5.2	1.10
42	Do.	Do.	10 mg cysteinhydrochloride	7.0	0.23
43	Do.	Do.		7.7	0.36
44	Do.	Do.		4.7	0.31
45	Do.	Do.	5 mg iodoacetic acid	4.7	0.23
46	Do.	Do. + 6 mg cysteinhydrochloride	5 mg iodoacetic acid	5.3	0.13

The experiments and their results

The glycerol extracts of digestive glands from the three investigated animals have a strong proteolytic action, and the effect is strong as well in the acid pH range (exp. 10, 15 and 20), as in the alkaline (exp. 14, 19 and 23), but the proteolytic effect is weaker in alkaline than in acid solution.

The series of experiments (Nos. 26–38) with a glycerol extract from digestive glands of *Mya arenaria*, carried out at different pH, gave a distinct optimum at pH = 5 and an indistinct one at pH = 7.1–7.6. The series is, however, not complete enough to determine the exact value of the optima. The data seem to indicate the occurrence of two proteases, and this conclusion was borne out by further experiments.

The enzyme, active in the acid range might be cathepsin. The following evidence is in favour of this contention. *Glycerol extracts from digestive glands showed upon addition of 5 to 6 mg cysteinhydrochloride a definite increase of activity, manifested by a twofold increase of the titer quantity.* (Cf exp. 15 and 16, 24 and 25.) The extracts were 5 to 19 days old in conformity with my experiences with *Helix*, where the fresh extracts were fully activated, and the activity then fell but could be largely restored by cysteinhydrochloride or by H_2S . On the other hand l-cystin had a checking effect (exp. 17). Thus the SH-form has an activating effect, but the S_2 -form a checking effect. The natural activator of cathepsin is considered to be SH-glutathion. *Monoiodoacetic acid has a considerable checking effect*, even with such small quantities as 5 mg in exp. 11, 18 and 21, and the checking effect is increased if the quantity of iodoacetic acid is increased (exp. 12, 13 and 22).

Weak activity was found with extracts from digestive glands previously treated with acetone and ether (exp. 6 and 39). It is, however, obvious that the conditions are more complicated than in the case of *Helix* and *Vivipara*, where the treatment of the mid-gut (digestive) gland with acetone and ether induced almost complete inactivity (Rosén 1932). In the Lamellibranchs there is a complication caused by the other protease, which has its optimum at pH = 7.1–7.6 but exhibits weak activity also in an acid solution. The cathepsin is, however, present in an inactive form, because *such an extract was strongly activated by passing H_2S through for 30 minutes* (compare exp. 6 and 7). To this extract, treated with H_2S , was added

monoiodoacetic acid to the amount of 5 mg per 1 ml extract, and this small quantity checked the proteolytic activity completely (exp. 9). An extract of digestive glands treated with acetone and ether, was strongly activated by cysteinhydrochloride in an acid solution (exp. 39, 40 and 41). These facts demonstrate that the natural activator was largely dissolved by the treatment with acetone and ether. Such an extract, activated with cysteinhydrochloride, had its activity checked almost completely by a small quantity of monoiodoacetic acid (exp. 46). All these experiments were made in an acid solution at an pH of about 5.5, so at the optimum of cathepsin, previously determinated according to *Helix* by myself (1932) and by G. HÖRSTADIUS-KJELLSTRÖM (1940). The above described experiments showed the reactions characteristic of cathepsin, and it is obvious that this protease, which has been found in the digestive gland in abundant quantities, is cathepsin. This protease has previously been found in the liver of vertebrates and in the mid-gut gland of *Helix pomatia* and of *Patella vulgata*. It could not, however, be found either in the mid-gut gland of the predatory gastropod *Buccinum undatum* or in that of *Astacus fluviatilis* and *Carcinus moenas* (Rosén 1937).

Glycerol extracts of glands treated with acetone and ether exhibit a proteolytic activity in an alkaline solution (exp. 8 and 43). This activity must be ascribed to a protease other than cathepsin, as, in fact, the cathepsin firstly is inactive in alkaline solution, and secondly has had the activator dissolved by the treatment of the glands with acetone and ether. Comparing experiments 43 and 42, I can find no activation of this protease by cysteinhydrochloride. This protease must, then, belong to a group of proteases other than cathepsin, and it may be questioned whether this protease is not the protease found earlier in the mid-gut gland of *Buccinum undatum*, *Carcinus moenas* and *Astacus fluviatilis*. In view of the position of the [H']-optimum, such a protease has been called "tryptase".

There is an obvious connection between these conditions of the enzymes and the nature of the food. *Helix pomatia* and *Patella vulgata* are herbivorous animals, and the cells of the food are freed by cellulase. The protoplasm of the cells is then digested intracellularly after phagocytosis, as has been shown in respect of both *Helix pomatia* (Rosén 1941) and *Patella vulgata* (Graham 1934). *Buccinum undatum*, *Carcinus moenas* and *Astacus fluviatilis*, on the other hand, are carnivorous animals and thus have need of an extracellular protease.

The occurrence of two proteases in the digestive gland of Lamellibranchs proves to be natural, as their food has been found to consist not only of minute particles of mainly plant origin (Yonge) but also of zooplankton (K. Mansour 1945, 1946). The animals can hardly help absorbing both phyto- and zooplankton. K. Mansour (1946) found copepods, larvae of Crustacea etc., either whole or in process of digestion, in the gastric juice of big marine Lamellibranchs. The function of the weak extracellular protease may be to free the cells of small Metazoa in the food. This interpretation is to be supported by the fact that this enzyme is completely absent in exclusive herbivorous Mollusca such as *Helix*, in which the function of freeing the cells of the food has been assumed by the cellulase. The very abundant occurrence of cathepsin, bound intracellularly in the digestive gland of Lamellibranchs, and the weak protease action of the gastric juice, indicate the very probable existence of an intracellular proteolysis in the digestive gland, and there is also experimental support for this (Vonk 1924). The value of these experiments, however, depends according to Krijgsman on the size of particles in the China ink used.

In carnivorous Gastropods there is an extracellular protease (Rosén 1937, Hörstadius 1940), but also a phagocytosis (Hörstadius 1940).

Some experiments were carried out with the object of investigating whether both proteases were extracellular. 10 digestive glands of *Mytilus edulis* were entire and unground put into 20 ml dist. water. After some minutes this first quantity was poured off, as the liquid was very clouded, and it was replaced by 20 ml dist. water. After 14 $\frac{1}{2}$ h. the water was centrifugated, and it was then clear but slightly discoloured. This water extract was used for experiments 1 and 2, which show that obviously the cathepsin is bound intracellularly (exp. 1), but the other protease is not intracellularly bound and can be extracted with water from entire, unground digestive glands (exp. 2). In the quite similar experiments with the entire, unground mid-gut glands of *Helix pomatia* no protease could be extracted with water (Rosén 1934). These digestive glands of *Mytilus edulis*, extracted with water, were then ground in a mortar, and a glycerol extract was prepared by adding 17 ml glycerol-water 4:1. Experiments 3, 4 and 5 were carried out with this glycerol extract. They show that all the cathepsin was left in the glands after extraction with water, and this can be extracted with glycerol from the ground glands. For experiment 3, which was carried on at $pH = 5.6$, shows a strong proteolytic action, which, in a parallel experiment, was reduced by half by the addition of 5 mg monoiodoacetic acid (exp. 4). The other protease had been largely extracted by the water, for the proteolytic effect was now much weaker (exp. 5).

Table 2

Action of filtered, undiluted gastric juice of *Mya arenaria* on 5 ml gelatine 6 % solution. 2 ml buffer solution. In No. 47 1 ml water in No. 48 1.5 ml water. Thymol. 37° C. 24 hours. Titration on 2 ml samples + 18 ml hot absolute alcohol.

No. of exp.	Agent	pH	Increase of acidity in n/10 KOH	Refrigerated after 24 hours
47	1 ml gastric juice	5.3	0.35	soft
48	$\frac{1}{2}$ » » »	7.4	0.54	fluid

I have also made some experiments with filtered gastric juice. 30 animals yielded 3 $\frac{3}{4}$ ml of stomach juice, $pH = 6.5$. The activity is generally very weak. Some of my experiments, however, have shown very marked proteolysis. Experiments 47 and 48, table 2, were carried out with *filtered* gastric juice from *Mya arenaria*, and the result was a relatively large titer value at $pH = 7.4$, a much smaller one at $pH = 5.3$. In the former case the gelatine entirely lost its property of gelling, in the second case partially, as the liquid was semifluid when cooled at the end of the experiment. In the corresponding experiment with the craw juice and also with the gastric juice of *Helix pomatia*, the liquid gelled completely. There is, then, no doubt about the existence of a protease in the filtered gastric juice of Lamellibranchs, as J. J. Mansour-Bek has maintained (1945, 1946). I cannot refrain from comparing the experiments with the gastric juice with the experiments with the water extracts from entirely unground digestive glands. They have had similar results, and this indicates that there must be an action of the same protease in both cases. This protease must be the one produced in the digestive gland with the $[H']$ -optimum

in the alkaline range. The small action at $p_H = 5.3$ is certainly a slight effect of the same enzyme, as the cathepsin has been proved by experiments to be intracellular.

J. J. Mansour-Bek adduces some results with Gastropoda arrived at by S. and G. Hörstadius as parallel to her own on Lamellibranchs and thinks the conditions to be quite similar. They have established that the craw juice of *Helix pomatia* decomposes casein and fibrin (Hörstadius 1940). As these two proteinases are the only ones which have got influence by the craw juice, there was a reason to investigate if this action is really effected by a protease in the craw juice. As to the casein, its solution is prepared in quite a different way from all other proteins. It is insoluble in water, and the usual method is to dissolve the casein in *lye* (cf Mansour-Bek 1932 p. 171). Svedberg (1930), however, has shown that proteins are instable in an alkaline solution at p_H over about 9, and the molecular weight falls tremendously, whereas the alkalinity rises. I have carried out some experiments with a solution of casein, prepared by dissolving casein in *phosphate buffer* $n/2$. The monophosphate solution must be added after the dissolving of the casein in the diphosphate (exp. 49–51) or in the diphosphate + a small amount of the monophosphate (exp. 52, 53). The casein was prepared exactly according to Hammarsten.

Table 3

0.2 gm Casein Hammarsten dissolved in 5 ml of phosphate buffer $n/2$ and 2 ml of craw juice of *Helix pomatia*. 33° C. 24 hours. Toluene.

No. of exp.	p_H	Increase in acidity in $n/10$ KOH
49	5.4	−0.04
50	6.5	0.04
51	6.5	0.03
52	7.4	0.09
53	7.4	0.04

Only one result is very slightly outside the limits of error. Thus the results show that the craw of *Helix pomatia* does not break down casein prepared in this way. I think that the explanation of this fact is that the p_H never reached the risk zone for the stability of the casein molecules, and no proteolysis can be established. The proteolysis established by other authors must, then, be some action of the peptidases in the craw juice on disaggregated molecules of casein. I have previously advanced these views (1932), and these experiments have proved them to be correct. These experiments have negated the result of Graetz and of G. Hörstadius-Kjellström arrived at with casein that the craw juice of *Helix pomatia* contains a protease which splits real proteins. As regards fibrine, I will return to this question in another connection. In the paper communicated by Mansour-Bek (1946, Tab. 1 p 16) there is a much larger titration value in the experiments with casein, peptone and polypeptides than in the experiments with gelatine and Ligamentum nuchae which tallies well with the explanation given above.

SUMMARY

The digestive (mid-gut) glands of *Mytilus edulis* L., *Ostrea edulis* L. and *Mya arenaria* L. contain considerable amounts of cathepsin. The cathepsin was identified by means of the characteristic reactions, activation by cysteinhydrochloride and by H_2S , a strong checking effect by monoiodoacetic acid, a weak checking effect by l-cystin. By treating the digestive glands with acetone and ether, the activator was largely dissolved, but the cathepsin could then be reactivated by means of cysteinhydrochloride or by H_2S . A series of experiments have shown that the digestive gland, apart from the cathepsin having its $[H']$ -optimum in the acid pH range (pH about 5) contains another protease with its $[H']$ -optimum in the alkaline range ($pH = 7.1-7.6$). This protease cannot be activated with cysteinhydrochloride and seems to be of the same nature as the protease found in *Buccinum undatum* L. and *Crustacea*. Unlike the cathepsin, it can be extracted by water from unground digestive glands, and is then not bound intracellularly in the digestive gland, but is secreted. In accordance with this fact a weak but clear protease action could be established with filtered gastric juice, and this action was much larger in an alkaline solution than an acid one. This protease is much too weak to account for all the splitting of proteins, but the abundant occurrence of cathepsin, bound intracellularly in the digestive gland, indicates a considerable intracellular digestion of proteins.

In connection with the result reached by SVEDBERG that the stability of proteins is due to pH , some experiments were carried out with casein dissolved in phosphate buffer as a substrate for protease action. Casein dissolved in lye is not suitable for demonstrating the existence or non-existence of a protease which splits real proteins. The proteolytic enzyme conditions are not quite the same in Lamelli-branchia and herbivorous Gasteropoda, which is due to the different nature of their food.

BIBLIOGRAPHY: Graham, A., Trans. roy. soc., Edinburgh. 57, 1934. — Hörstadius, G. and S., Publ. della Staz. Zool. di Napoli. 18, 1940. — Mansour-Bek, J. J., Proc. Egypt. Acad. Sci. 1, 1945. — Mansour-Bek, J. J., Nature 158, 1946. — Mansour, K., Proc. Egypt. Acad. Sci. 1, 1945. — Mansour, K., Nature, 158, 1946. — Rosén, B., Zool. bidrag, Upsala, 14, 1932. — Rosén, B., Z. vergl. Physiol. 21, 1934. — Rosén, B., Z. vergl. Physiol. 24, 1937. — Rosén, B., Zool. Jahrb. 60, 1941. — Svedberg, T., Trans. Farad. Soc. 26, 1930. — Svedberg, T., Koll. Zeitschr. 51, 1930. — Vonk, H. J., Z. vergl. Physiol. 1, 1924. — Yonge, C. M., J. of exp. biol. 1, 1923. — Yonge, C. M., Nature, March 1930. — Yonge, C. M., J. Mar. Biol. Assoc. 20, 1935.

Tryckt den 28 juni 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



The crystal structure of tetragonal potassium tungsten bronze

By ARNE MAGNÉLI

With 2 figures in the text.

Since LAURENT (1) in 1838 gave the first report on the synthesis of a potassium tungsten bronze a number of papers concerning this matter have appeared. Various methods of preparation have been given: e. g. reduction of acid potassium tungstate at a high temperature by hydrogen (1) or tin (2), electrolysis of fused potassium polytungstate (3), and melting mixtures of acid potassium tungstate with tungsten dioxide under exclusion of air (4). As to the number and composition of existing potassium tungsten bronzes opinions have diverged. The formulae $K_2W_3O_9$ (5) and $K_2W_4O_{12}$ (2, 6, 7) have been given for a compound described as forming reddish-violet needles. Furthermore, a few authors have mentioned certain blue products as consisting of $K_2W_5O_{15}$ (5) or mixtures of several bronzes ($K_2W_4O_{12}$ up to $K_2W_8O_{24}$) (4).

Preparation and analysis

By heating potassium tungstate, tungsten trioxide and tungsten dioxide *in vacuo* for about 15 minutes at temperatures between 900° and 1100° C in an electric furnace and purifying the products by successive repeated boiling with concentrated potassium carbonate solution, concentrated hydrochloric acid and aqua regia, beautiful reddish-violet prisms of a bronze-like compound were obtained. They always appeared highly contaminated by a dark blue crystalline substance. Attempts to separate the two species, except by picking out the one, were fruitless.

However, by reducing acid potassium tungstates — obtained by heating mixtures of potassium carbonate (Merck pro analysi) and tungstic acid (Kahlbaum pure) — in a slow stream of hydrogen at about 600° C and purifying the products as above, preparations of the bronze were acquired in apparently pure form, as was established by microscopic examination and from powder photographs. The bronze prepared in this way forms very small reddish-violet needles.¹

A separate account of the methods used in analysing the bronze will be given elsewhere (8).

The analyses showed the compound to be of variable composition, K_xWO_3 , a variation of x between 0.475 and 0.57 being observed. Although the compositions of the starting mixtures when synthesizing the bronze were varied within wide

¹ Attempts to synthesize rubidium bronzes in an analogous way only gave dark blue products, very similar to those mentioned above.

limits, the above values were never exceeded and thus ought to correspond rather closely to the limits of the homogeneity range at the temperatures in question.

It is worthy of note that the colour of the potassium tungsten bronze bears a close resemblance to that of the γ -tungsten oxide (9) of a composition close to $\text{WO}_{2.75}$ and thus having about the same average charge of the W atoms as the bronze. The colours of the cubic sodium tungsten bronzes of various compositions given by HÄGG (10) generally refer to rather large crystals and are not directly comparable with the colours of the finely divided crystal powders investigated here. However, by grinding a few crystals of the red preparation $\text{Na}_{0.62}\text{WO}_3$ made by HÄGG the hue of the sample gradually deepened and grew reddish-violet.

Lattice dimensions and cell content

Powder photographs were taken from the preparations in focusing cameras using Cr-*K* radiation. The observed reflections satisfy a tetragonal quadratic form. Lattice constants of preparations of different compositions are listed in Table 1, as are the corresponding density values. There is fair agreement between the observed densities and those calculated on the assumption of a cell content of ten formula units.

Table 1.

Syntheses, Unit Cell Dimensions¹ and Densities of Preparations of Tetragonal Potassium Tungsten Bronze.

Composi- tion	Synthesized from	Time and Tempera- ture of Reduction	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>V</i>	$\rho_{\text{obs.}}$	$\rho_{\text{calc.}}$ ²
$\text{K}_{0.475}\text{WO}_3$	$\text{K}_2\text{O} \cdot 3.5 \text{WO}_3$	40 minutes 650° C	12.285 Å	3.833 Å	578.5 Å ³	7.10	7.19
$\text{K}_{0.54}\text{WO}_3$	$\text{K}_2\text{O} \cdot 2\text{WO}_3$	30 minutes 600° C	12.311	3.840	582.0		
$\text{K}_{0.57}\text{WO}_3$	$\text{K}_2\text{O} \cdot 1.2 \text{WO}_3$	100 minutes 600° C	12.317	3.841	582.7		

Single crystal photographs

In order to diminish the influence of absorption in the single crystal photographs these were taken with Mo-*K* radiation using rather small crystals, that were picked out from preparations obtained by melting acid potassium tungstate with tungsten dioxide. Crystals produced by reduction with hydrogen were too small for this purpose. The Laue symmetry was found to be $D_{4h}-4/mmm$ with the tetragonal axis parallel to the needle axis. Rotation and Weissenberg photographs were taken around $[0\ 0\ 1]$ (the layer lines 0-4) and $[1\ 0\ 0]$ (the equator layer line). When rotating around the latter axis a crystal was chosen with an extension parallel to $[0\ 0\ 1]$, only moderately exceeding the dimensions normal to this axis.

The intensities were estimated visually, starting from 4 : 2 : 1 as relative values for the intensities of Mo-*K* α_1 , Mo-*K* α_2 , and Mo-*K* β radiation. The photograph

¹ Calculated under the assumption that the wave lengths of Cr-*K* α_1 and Cr-*K* α_2 radiation are 2.28962 and 2.29352 Å respectively.

² Corresponding to ten formula units per cell.

registering the reflections $0\ k\ l$ was used when correlating the intensity scales of the Weissenberg photographs around $[0\ 0\ 1]$. The correlation was controlled by taking a "Weissenberg oscillation photograph" around $[0\ 0\ 1]$ in the way described in a previous paper (11). Relative values of the structure amplitudes were obtained by multiplying the intensity values by $\cos^2 \mu \cdot \sin 1/(1 + \cos^2 \theta)$, using the curves of CHIA-SI LU (12). The temperature factor was not taken into consideration. All Fourier summations were carried out by means of the HÄGG-LAURENT machine (13).

The only systematically missing reflections are $0\ k\ l$, when k is odd. This is characteristic of the space-groups $D_{4h}^2 - P4/mbm$, $C_{4v}^2 - P4bm$, and $D_{2d}^2 - P\bar{4}b2$.

The X-ray photographs of this bronze are quite similar to those of the tetragonal blue sodium tungsten bronze described by HÄGG (10). This compound, however, has a unit cell four times as large as the one corresponding to the cell of the potassium compound given above (14). This superstructure gives rise to very faint reflections in the single crystal photographs, as was first observed by HÄGG and LINDQVIST.¹ No such effects could be detected in the photographs of the potassium tungsten bronze, even after very ample exposure.

Tungsten positions

The appearance of the projection of the Patterson function on the c axis, $p(z)$, not showing any strong maxima besides the peak at the origin, makes it probable that all the heavy W atoms² have the same z coordinate. Such an arrangement would be in harmony with the symmetry $P4/mbm$, the W atoms being situated in a mirror plane normal to the tetragonal axis. The consistency of the structure with that space-group will be examined first.

The arrangement of the W atoms with regard to the fourfold axis, irrespective of it being 4 or $\bar{4}$, must appear in the cut $P(xy\ 0)$ in the Patterson function. This cut is illustrated in Fig. 1. Apart from the peak at the origin all the heavy maxima are of about the same height, although those indexed C comprise greater areas than the others. The Patterson projection parallel to $[1\ 0\ 0]$, $p(yz)$, shows the absence of any other important peaks in the Patterson function and gives the z coordinates of the maxima observed in $P(xy\ 0)$ exactly equal to 0, which supports the assumption concerning the arrangement of the W atoms given above. The following distribution of ten W atoms is in full harmony with the appearance of the Patterson function. It requires two neighbouring maxima at C in $P(xy\ 0)$, thus even explaining the form of that peak. The z coordinates of the W positions are arbitrarily chosen equal to $\frac{1}{2}$.

Space-group $P4/mbm^3$

2 W₁ in 2(c): $0\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}$

8 W₂ in 8(j): $xy\ \frac{1}{2}$ $x = \frac{x_B - x_A}{2}$ $y = \frac{1 - x_B - x_A}{2}$

On basis of these parameter values it is possible to determine the sign of most F_{hkl} values, as the influence of the W atoms dominates over the contributions of the K

¹ Private communication.

² The word atom is used throughout this paper irrespective of the charge of the various species.

³ Notations according to "International Tables for the Determination of Crystal Structures." Berlin 1935.

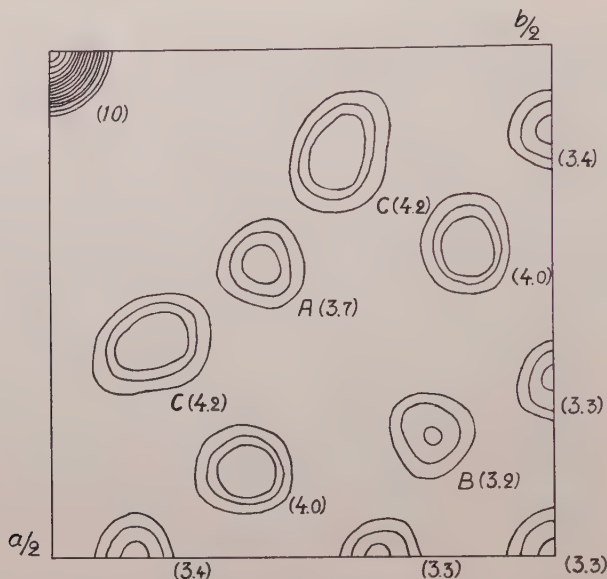


Fig. 1. The cut $P(xy\ 0)$ in the Patterson function. The figures denote the relative heights of the maxima.

and O atoms. The cut $\rho(xy\ \frac{1}{2})$ in the electron density function then gives improved coordinate values:

$$x(W_2) = 0.078 \qquad y(W_2) = 0.209$$

The accuracy of these figures is estimated to be a few p.mille.

Potassium positions

The composition of the crystal used in the single crystal investigation roughly corresponds to a cell content of six K atoms. If $P4/mbm$ is the actual space-group these atoms for space reasons must be situated in the mirror planes normal to the tetragonal axis. The possibility of K atoms being situated in the point position $2(d)$ seems highly improbable due to the proximity of the W atoms in $2(c)$. The only possible point positions are then the fourfold position $4(g)$ and $4(h)$ and the twofold ones $2(a)$ and $2(b)$. The cuts $\rho(x\ 0\ z)$ and $\rho(x\ \frac{1}{2}\ z)$ in the electron density function were thus examined for maxima corresponding to K atoms. As a matter of fact the former cut, besides heavy peaks evidently caused by the W atoms close by, shows rather weak maxima interpretable as due to two K atoms in $2(a)$ and four in $4(g)$:

$$\begin{array}{l} 2\ K_1\ \text{in}\ 2(a): \quad 0 \quad 0 \quad 0 \\ 4\ K_2\ \text{in}\ 4(g): \quad x\ \frac{1}{2} + x \quad 0 \quad x = 0.175 \end{array}$$

The accuracy of the parameter of the fourfold position is probably not very high.

Oxygen positions

The W and K distribution arrived at is in accordance with the space-group $P4/mbm$. The O atom lattice will be examined in view of the possibility that it too may have that symmetry. Then these atoms as well as the K atoms must for space reasons be situated in the mirror planes normal to the tetragonal axis. However, the cuts $\varrho(x0z)$ and $\varrho(x\frac{1}{2}z)$ do not show any maxima interpretable as corresponding to O atoms. This was of course to be expected due to the low scattering power of oxygen compared with the other atomic species of the lattice. The O positions then have to be discussed from considerations of space.

Adjacent W atoms of the lattice are generally about 3.8 Å apart. This distance corresponds to the length of the space diagonal of a regular WO_6 octahedron (*cf.* (10)) and ought to allow O atoms to be inserted between neighbouring W atoms. However, in order to obtain reasonable O-O and K-O distances, certain O atoms must be displaced from the middle points of the corresponding W-W connection lines. This must be the case especially for the O atoms that are inserted between the W atoms forming equilateral triangles (*cf.* Fig. 2) and seems very likely for the O atoms bordering upon the K_1 atoms. In this way the following scheme for the distribution of the thirty O atoms of the unit cell, consistent with the symmetry $P4/mbm$ and giving a reasonable state of coordination and satisfactory interatomic distances, is arrived at:

2 O_1 in 2(d):	$0 \quad \frac{1}{2} \quad 0$		
8 O_2 in 8(i):	$x \quad y \quad 0$	$x = 0.075$	$y = 0.215$
4 O_3 in 4(h):	$x\frac{1}{2} + x\frac{1}{2}$	$x = 0.29$	
8 O_4 in 8(j):	$x \quad y \quad \frac{1}{2}$	$x = 0$	$y = 0.345$
8 O_5 in 8(j):	$x \quad y \quad \frac{1}{2}$	$x = 0.15$	$y = 0.07$

Description of the structure

The following structure is proposed for the investigated tetragonal potassium tungsten bronze of a composition approximating $K_{0.6}WO_3$. The W and K parameter values have been deduced from the X-ray data, the former being rather accurate, the latter approximate. The O positions have been derived from considerations of space.

Cell content: $K_6W_{10}O_{30}$
 Space-group: D_{4h}^2-P4/mbm

2 W_1 in 2(c):	$0 \quad \frac{1}{2} \quad \frac{1}{2}$		
8 W_2 in 8(j):	$x \quad y \quad \frac{1}{2}$	$x = 0.078$	$y = 0.209$
2 K_1 in 2(a):	$0 \quad 0 \quad 0$		
4 K_2 in 4(g):	$x\frac{1}{2} + x0$	$x = 0.175$	
2 O_1 in 2(d):	$0 \quad \frac{1}{2} \quad 0$		
8 O_2 in 8(i):	$x \quad y \quad 0$	$x = 0.075$	$y = 0.215$
4 O_3 in 4(h):	$x\frac{1}{2} + x\frac{1}{2}$	$x = 0.30$	
8 O_4 in 8(j):	$x \quad y \quad \frac{1}{2}$	$x = 0$	$y = 0.345$
8 O_5 in 8(j):	$x \quad y \quad \frac{1}{2}$	$x = 0.15$	$y = 0.07$

A projection of the unit cell parallel to $[0\ 0\ 1]$ is represented in Fig. 2. Observed and calculated structure factor values for a number of reflections are given in Table 2. The contribution of the K and O atoms to F is often of less importance than the inaccuracy connected with the visual estimation of the intensities. However, for some reflections the influence of these light atoms is considerable and accounts rather well for irregularities of the observed structure factor values. (Cf. reflections $0\ 8\ l$ and others.)

The lattice is constructed of WO_6 octahedra joined by corners, every O atom thus being common to two W atoms. This agrees with the atomic ratio 3 : 1 of these two

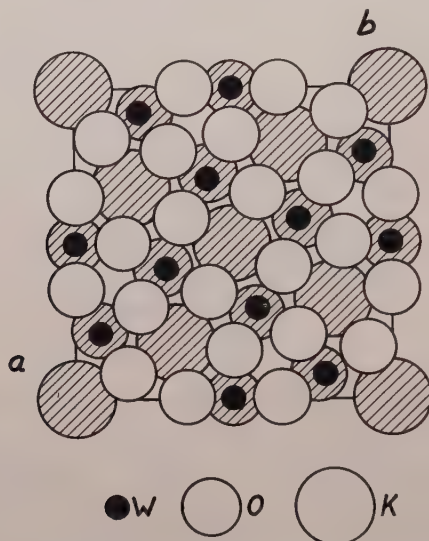


Fig. 2. Projection of the structure parallel to $[0\ 0\ 1]$. The atoms marked with lines are situated at $z = 0$, the other ones at $z = \frac{1}{2}$. The atoms at $z = 1$ are omitted.

species of atoms. Parallel to $(0\ 0\ 1)$ the octahedra are coupled together in a rather intricate way forming rings or polygons of three, four or five octahedra. The K atoms are situated in the interstices between adjacent tetragons (K_1) and pentagons (K_2). The K_1 atoms, coordinating twelve O atoms, are thus inserted in the lattice in the same way as are the Na atoms of the cubic sodium tungsten bronze (10), although the K atoms due to their size probably deform the neighbouring WO_6 octahedra. The K_2 atoms are surrounded in various distances by fifteen O atoms, a few of them being rather remote.

The distances between W atoms surrounding encompassing triangles (cf. Fig. 2) are rather short, 3.71 Å, whereas those encircling tetragons are 3.88 Å apart. The W-W sides of the pentagons are thus of various lengths. The distance parallel to $[0\ 0\ 1]$ between identical W atoms, coinciding with the height of the unit cell, is 3.85 Å.

The W-O distances estimated from the proposed O positions vary between 1.9 and 1.95 Å with an average value of 1.92 Å. This is in close agreement with the W-O distance 1.920 Å calculated for the cubic sodium tungsten bronze $\text{Na}_{0.62}\text{WO}_3$.

Table 2.

Weissenberg photographs with Mo-*K* radiation.
Comparison between observed and calculated $|F|$ values.

hkl	$ F $		hkl	$ F $		hkl	$ F $	
	obs.	calc.		obs.	calc.		obs.	calc.
0 0 1	430	640	1 5 1	—	0	2 7 1	—	110
0 0 2	610	770	1 5 2	—	20	2 7 2	—	40
0 0 3	460	440	1 5 3	—	10	2 7 3	—	90
0 0 4	580	500	1 5 4	—	20	2 7 4	—	30
0 0 5	350	330	1 6 0	—	80	2 8 0	240	240
0 0 6	400	410	1 6 1	—	50	2 8 1	—	130
0 0 7	190	260	1 6 2	—	70	2 8 2	170	210
0 0 8	—	310	1 6 3	—	40	2 8 3	—	110
0 0 9	—	200	1 6 4	—	50	2 8 4	180	170
0 4 0	190	200	1 7 0	380	370	2 9 0	—	30
0 4 1	130	120	1 7 1	340	340	2 9 1	—	60
0 4 2	100	150	1 7 2	360	310	2 9 2	—	20
0 4 3	—	100	1 7 3	270	270	2 9 3	—	50
0 4 4	—	110	1 7 4	260	240	2 9 4	—	20
0 6 0	—	10	1 8 0	—	70	2 10 0	140	140
0 6 1	—	120	1 8 1	—	20	2 10 1	—	90
0 6 2	—	20	1 8 2	—	60	2 10 2	—	130
0 6 3	—	100	1 8 3	—	20	2 10 3	—	80
0 6 4	—	20	1 8 4	—	50	2 10 4	—	110
0 8 0	180	190	1 9 0	—	40	3 3 0	260	190
0 8 1	—	140	1 9 1	—	30	3 3 1	—	100
0 8 2	140	160	1 9 2	—	30	3 3 2	220	160
0 8 3	—	110	1 9 3	—	30	3 3 3	—	90
0 8 4	—	130	1 9 4	—	30	3 3 4	140	120
0 10 0	320	340	1 10 0	140	200	3 4 0	—	20
0 10 1	250	240	1 10 1	160	220	3 4 1	—	40
0 10 2	270	280	1 10 2	130	170	3 4 2	—	20
0 10 3	190	210	1 10 3	—	190	3 4 3	—	30
0 10 4	200	230	1 10 4	—	150	3 4 4	—	20
0 12 0	160	130	2 3 0	360	300	3 5 0	—	110
0 12 1	—	40	2 3 1	290	240	3 5 1	—	10
0 12 2	—	120	2 3 2	280	240	3 5 2	—	90
0 12 3	—	30	2 3 3	220	190	3 5 3	—	10
0 12 4	—	100	2 3 4	230	170	3 5 4	—	60
0 14 0	400	370	2 4 0	300	300	3 6 0	360	280
0 14 1	310	360	2 4 1	140	160	3 6 1	230	240
0 14 2	280	340	2 4 2	220	250	3 6 2	250	240
0 14 3	290	330	2 4 3	150	140	3 6 3	210	190
0 14 4	260	300	2 4 4	210	190	3 6 4	220	180
1 3 0	310	260	2 5 0	—	50	3 7 0	—	20
1 3 1	350	290	2 5 1	—	10	3 7 1	—	30
1 3 2	270	210	2 5 2	—	30	3 7 2	—	20
1 3 3	190	220	2 5 3	—	10	3 7 3	—	20
1 3 4	210	150	2 5 4	—	20	3 7 4	—	20
1 4 0	370	360	2 6 0	330	330	3 8 0	290	270
1 4 1	220	200	2 6 1	330	300	3 8 1	230	220
1 4 2	370	300	2 6 2	270	280	3 8 2	230	230
1 4 3	150	170	2 6 3	200	240	3 8 3	220	180
1 4 4	240	220	2 6 4	250	210	3 8 4	180	190
1 5 0	—	20	2 7 0	—	40			

on basis of the data given by HÄGG (10)¹ as well as with the values 1.86–1.91 Å proposed by BRÄKKEN for WO₃ (15).

The distances between the K₁ atoms and the twelve O atoms surrounding them are about 2.8 Å. This may be compared with the K–O distance 2.82 and 2.83 Å of KTaO₃ (16) and KNbO₃ (16, 17), both of them crystallizing according to the perovskite type ABO₃ and containing small B atoms. Although the W atom is still smaller than are the Ta and Nb atoms, the K–O distance for 12-fold coordination cannot possibly acquire smaller values. The arrangement of the O atoms around the K₂ atoms is a rather irregular one. Six O atoms forming a triangular prism are the closest neighbours at distances of 2.8–2.9 Å. Seven O atoms occur at distances of 3.05–3.15 Å and two very remote ones are situated 3.35 Å from the K₂ atoms. However, relatively slight displacements of the O atoms will cause considerable changes in the environment of the K₂ atoms.

All the O–O distances are of reasonable lengths, ranging from 2.9 to 2.55 Å.

Discussion of the structure

A potassium analogue to the cubic sodium tungsten bronze of perovskite type has never been reported in literature and it seems rather unlikely that such a compound could be synthesized as there has been a good deal of work in this field. ZACHARIASEN (18) has given an equation that must be satisfied if a compound ABO₃ crystallizes according to the perovskite structure, formulated here according to STILLWELL (19):

$$1.06 (R_A + R_O) = t \sqrt{2} [0.95 (R_A + R_O)], \quad t = 1.0 \pm \text{approximately } 0.1$$

where R denotes the radii of the ions in 6-fold coordination and t is the so-called tolerance factor. The value of about 1.1 calculated for a potassium tungsten bronze shows such a compound to be close to the limit of stability of a structure of this type. It is then interesting that the structure of the tetragonal bronze actually investigated contains in fact elements constructed according to a slightly deformed perovskite type, *viz.* the K₁ atoms with the WO₆ octahedra surrounding them. In this way the lattice may be looked upon as built up of strings of a perovskite lattice with infinite extension parallel to [0 0 1] cemented to each other by means of the W₁, K₂ and O₁ atoms.

As mentioned above photographs of preparations of various compositions of the bronze show slight displacements of the reflections due to the variation of the unit cell dimensions but no extra reflections indicating the occurrence of a superstructure have been observed. The bronze thus forms a continuous series of solid solutions, the structure described above approximating the member richest in potassium. As the homogeneity range is relatively narrow it must be very ticklish or even impossible to decide from the intensities of the X-ray reflections which K sites may be unoccupied. If the vacancies occur exclusively in the perovskite (K₁) positions, presenting a more limited space than the K₂ positions, the fraction of unoccupied perovskite sites varies within about the same interval as for the cubic sodium tungsten bronze (10), the approximate limits being Na_{0.93}WO₃–Na_{0.32}WO₃ and K_{0.85}[K₂W₅O₁₅] (=K_{0.57}WO₃)–K_{0.375}[K₂W₅O₁₅] (=K_{0.475}WO₃).

¹ The figures of that paper, being in fact expressed in kX units, are converted here into Å units.

SUMMARY

The tetragonal potassium tungsten bronze has been shown to form a continuous series of solid solutions within the approximate limits $K_{0.475}WO_3$ and $K_{0.57}WO_3$. The structure has been investigated by means of X-rays and in this way the W and K positions have been settled. O positions have been proposed from considerations of space. The lattice thus arrived at is composed of WO_6 octahedra joined by sharing corners in a rather intricate way. The K atoms are inserted in the larger interstices. The relation to the cubic sodium tungsten bronze of the perovskite type is discussed.

The author wishes to express his thanks to Professor G. HÄGG for his continued interest in this investigation. He is also indebted to Mr. BENGT TOLLANDER for his valuable assistance with the calculations. The Swedish Natural Science Research Council has supported the research financially which support is gratefully acknowledged.

Institute of Chemistry, University of Uppsala, January 1949.

REFERENCES. 1. **Laurent, A.**, Ann. Chim. Phys. (2) 67 (1838) 215. — 2. **von Knorre, G.**, J. prakt. Ch. (2) 27 (1883) 49. — 3. **Zettnow, E.**, Pogg. Ann. 130 (1867) 240. — 4. **Brunner, O.**, Dissert. Zürich (1903). — 5. **Hallopeau, M. L.-A.**, Ann. Chim. Phys. (7) 19 (1900) 92. — 6. **von Knorre, G.** and **Schäfer, E.**, Ber. 35 (1902) 3407. — 7. **Schäfer, E.**, Z. anorg. Ch. 38 (1903) 142. — 8. **Magnéli, A.**, Unpublished. — 9. **Hägg, G.** and **Magnéli, A.**, Arkiv för Kemi etc. 19 A, N:o 2 (1944). — 10. **Hägg, G.**, Z. phys. Ch. (B) 29 (1935) 192. — 11. **Magnéli, A.**, Acta Chem. Scand. 2 (1948) 501. — 12. **Chia-Si Lu**, Rev. Sci. Instr. 14 (1943) 331. — 13. **Hägg, G.** and **Laurent, T.**, J. Sci. Instr. 23 (1946) 155. — 14. **Magnéli, A.**, Unpublished. — 15. **Bräkken, H.**, Z. Krist. 78 (1931) 484. — 16. **Quill, L. L.**, Z. anorg. Ch. 208 (1932) 257. — 17. **Goldschmidt, V. M.**, Geochemische Verteilungsgesetze der Elemente VIII, Oslo (1927). — 18. **Zachariasen, W. H.**, Skrift. Norske Videnskapsakademie Oslo (1928) N:o 4. — 19. **Stillwell, C. W.**, Crystal Chemistry, New York and London 1938.

Tryckt den 23 juni 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Crystal structure studies on γ -tungsten oxide

By ARNE MAGNÉLI

With 2 figures in the text

In an account of a phase analysis of the system tungsten-oxygen carried out at this Institute (1) a few preliminary data were given concerning the γ -tungsten oxide. It was stated that this phase, forming very small reddish-violet needles, has a composition close to the value $\text{WO}_{2.75}$ proposed by GLEMSEER and SAUER (2) but possibly somewhat poorer in oxygen than this formula. Unit cell dimensions were given as calculated from single crystal photographs taken with Cr- K radiation around the needle axis. The reflections registered in these photographs made possible the space-groups C_s^1 - Pm , C_2^1 - $P2_1$, C_2^2 - $P2_1$, C_{2h}^1 - $P2_1/m$, and C_{2h}^2 - $P2_1/m$.

During further investigation of the oxide, Weissenberg photographs were taken with rotation around the monoclinic axis (the needle axis) using Cu- K (layer lines 0-2) and Mo- K radiation (layer lines 0-4). The crystals were too small to allow a setting for rotation around other axes. Relative intensities of the reflections were estimated visually, 4 : 2 : 1 being adopted as the intensity ratio of $K\alpha_1$, $K\alpha_2$, and $K\beta$ radiations respectively. The correlation between the intensity scales of the photographs of the various layer lines was obtained from "Weissenberg oscillation photographs" as has been described elsewhere (3). The structure amplitudes were computed by multiplying the intensity values by $\cos^2 \mu \cdot \sin Y / (1 + \cos^2 \Theta)$, applying the curves of CHIA-SI LU (4). The temperature factor was neglected. The Fourier summations were calculated by means of the HÄGG-LAURENT machine (5) and for wave numbers exceeding 16 with the ROBERTSON strips (6).

The reflections of the photographs taken with Mo- K radiation were very weak and showed a pronounced intensity fall at higher diffraction angles. Thus the layer line with $k = 5$ was not observed at all and only a minor fraction of the spots registered in the Cu- K photographs ($k = 0-2$) was to be found when using the harder radiation. For that reason all the Fourier summations had to be carried out on basis of the Cu- K photographs.

Starting from the approximate unit cell dimensions obtained from the single crystal photographs it was possible to index powder photographs of the oxide taken with Cr- K radiation in focusing cameras up to moderately high diffraction angles. In this way the following unit cell dimensions were arrived at:

$$a = 18.32 \text{ \AA}^1, b = 3.79 \text{ \AA}, c = 14.04 \text{ \AA}, \beta = 115^\circ 2, V = 882 \text{ \AA}^3.$$

¹ Referred to the wave length of Cr- $K\alpha$ radiation = 2.2909 Å.

As the reflection 0 1 0 is present in the powder photographs, space-groups containing twofold screw axes must be out of the question and only C_5^1-Pm , C_2^1-P2 , and C_{2h}^1-P2/m need be taken into consideration.

Tungsten positions

The density value of 7.72 reported by GLEMSER and SAUER (2) corresponds to a cell content of 18 formula units of the approximate composition $WO_{2.75}$. Leaving the number of O atoms out of the question for the present, this indicates that the unit cell mentioned above must contain 18 W atoms.

The observed values of the structure amplitudes of reflections hkl with h and l constant are generally uniformly decreasing with k increasing. The deviations from this law are so slight that they may be interpreted as due to the inaccuracy connected with the visual estimation of the intensities or, less probably, to the influence of the

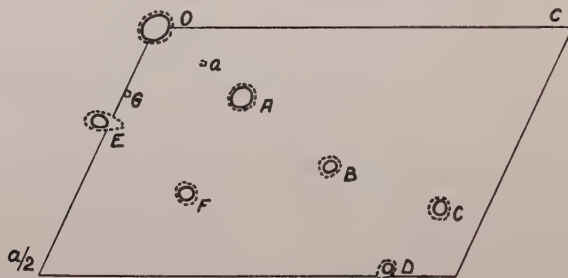


Fig. 1. Projection of the Patterson function parallel to [0 1 0].

O atoms. All the W atoms of the cell thus ought to be situated in one plane normal to the b axis. The y coordinate of this plane was arbitrarily chosen equal to $\frac{1}{2}$.

The projection of the Patterson function parallel to [0 1 0], $p(xz)$, contains a very great number of maxima, arranged in a complicated way. Fig. 1. shows the major maxima of this projection together with a few minor ones close to the origin, O. The heavy peaks A and E are situated about 3.7 Å from O. This distance, approximately equal to the length of the b axis (the W-W distance in the b direction), corresponds to the identity period of a hypothetical WO_3 lattice of $D0_9$ -type (ReO_3 -type) (7). (Cf. WO_3 which according to BRÄKKEN (8) constitutes a lattice of deformed $D0_9$ -type.) The presence of the almost square figure OAFE in the Patterson projection indicates, that W atoms, disposed according to a somewhat distorted $D0_9$ -arrangement, play an important rôle in the structure. An estimation of the extension of this "D 0_9 -lattice" from the calculated projection is rather questionable due to the very complicated nature of this projection, which later turned out to be less reliable concerning the magnitude of the maxima. However, the presence of the heavy peaks B and C in the directions of OA and OE and at distances from the origin of two times OA and OE respectively, indicates a possible extension of at least three W atoms in these directions.

There are a few minor maxima in $p(xz)$ probably corresponding to vectors between adjacent W atoms. They are, however, rather diffuse except for the one denoted by G. The distance OG, being about 2.5 Å, is equal to the shortest W-W distance of WO_2 (9).

Table 1.

Weissenberg photographs with Cu-K radiation.
Comparison between observed and calculated $|F|$ values.

$h \ l$	$k = 0$			$k = 1$			$k = 2$		
	$\sin^2 \Theta$	$ F _{\text{obs.}}$	$ F _{\text{calc.}}$	$\sin^2 \Theta$	$ F _{\text{obs.}}$	$ F _{\text{calc.}}$	$\sin^2 \Theta$	$ F _{\text{obs.}}$	$ F _{\text{calc.}}$
2 0	0.009	80	80	0.050	80	70	0.174	—	60
3 0	0.019	—	40	0.060	—	30	0.184	—	30
4 0	0.035	—	60	0.076	—	60	0.200	—	50
5 0	0.054	140	150	0.095	170	140	0.219	110	120
6 0	0.078	430	560	0.119	410	520	0.243	330	460
7 0	0.106	—	60	0.147	—	60	0.271	—	50
8 0	0.138	—	50	0.179	—	40	0.303	—	40
9 0	0.175	—	40	0.216	—	40	0.340	—	30
10 0	0.216	170	120	0.257	190	120	0.381	—	110
11 0	0.262	210	200	0.303	210	200	0.427	—	180
12 0	0.311	—	20	0.352	—	20	0.476	—	20
13 0	0.366	—	20	0.407	—	20	0.531	—	10
14 0	0.424	310	280	0.465	280	270	0.589	180	250
15 0	0.487	190	200	0.528	160	200	0.652	130	180
16 0	0.554	—	40	0.595	—	40	0.719	—	40
17 0	0.625	—	20	0.666	—	20	0.790	—	20
18 0	0.701	190	130	0.742	210	130	0.866	150	120
19 0	0.781	—	20	0.822	—	20	0.946	—	20
20 0	0.865	170	190	0.906	160	190	—	—	—
21 0	0.954	270	340	—	—	—	—	—	—
0 2	0.015	—	0	0.056	—	0	0.180	—	0
0 3	0.033	—	20	0.074	—	20	0.198	—	20
0 4	0.059	400	430	0.100	410	400	0.224	340	350
0 5	0.092	150	160	0.133	150	150	0.257	—	130
0 6	0.133	—	20	0.174	—	20	0.298	—	20
0 7	0.180	480	550	0.221	470	520	0.345	330	470
0 8	0.236	320	280	0.277	280	270	0.401	180	240
0 9	0.298	160	110	0.339	—	110	0.463	—	100
0 10	0.368	—	100	0.409	—	90	0.533	—	90
0 11	0.446	—	180	0.487	—	170	0.611	—	160
0 12	0.530	210	180	0.571	—	180	0.695	—	170
0 13	0.622	130	100	0.663	—	100	0.787	—	100
0 14	0.722	—	40	0.763	—	40	0.887	—	40
0 15	0.829	—	80	0.870	—	70	—	—	—
0 16	0.943	130	100	—	—	—	—	—	—
5 10	0.302	—	30	0.343	—	30	0.467	—	30
5 9	0.244	380	400	0.285	350	380	0.409	250	350
5 8	0.194	—	10	0.235	—	10	0.359	—	10
5 7	0.150	130	130	0.191	—	120	0.315	—	110
5 6	0.115	—	0	0.156	—	0	0.280	—	0
5 5	0.086	—	60	0.127	—	50	0.251	—	50
5 4	0.065	250	250	0.106	240	230	0.230	170	200
5 3	0.051	410	550	0.092	410	510	0.216	320	440
5 2	0.045	450	680	0.086	390	630	0.210	320	540
5 1	0.046	130	150	0.087	110	140	0.211	—	120
5 1	0.070	450	660	0.111	440	620	0.235	380	540
5 2	0.093	—	30	0.134	—	30	0.258	—	20
5 3	0.123	—	90	0.164	—	80	0.288	—	70
5 4	0.161	290	380	0.202	300	360	0.326	220	320
5 5	0.206	—	10	0.247	—	10	0.371	—	10

Table 1 (contd.).

<i>h l</i>	<i>k</i> = 0			<i>k</i> = 1			<i>k</i> = 2		
	$\sin^2 \Theta$	F _{obs.}	F _{calc.}	$\sin^2 \Theta$	F _{obs.}	F _{calc.}	$\sin^2 \Theta$	F _{obs.}	F _{calc.}
5 6	0.259	—	10	0.300	—	10	0.424	—	10
5 7	0.318	—	0	0.359	—	0	0.483	—	0
5 8	0.386	360	430	0.427	320	420	0.551	290	390
5 9	0.460	180	150	0.501	160	150	0.625	—	140
5 10	0.542	—	100	0.583	—	90	0.707	—	90
10 10	0.344	—	40	0.385	—	40	0.509	—	40
10 9̄	0.298	130	140	0.339	120	140	0.463	—	130
10 8̄	0.260	210	250	0.301	230	240	0.425	150	220
10 7̄	0.228	—	50	0.269	—	50	0.393	—	50
10 6̄	0.205	190	190	0.246	130	180	0.370	—	170
10 5̄	0.188	590	660	0.229	580	630	0.353	380	570
10 4̄	0.179	210	160	0.220	220	150	0.344	160	140
10 3̄	0.177	210	200	0.218	180	190	0.342	130	170
10 2̄	0.183	190	180	0.224	130	170	0.348	—	150
10 1̄	0.196	600	660	0.237	490	640	0.361	390	570
10 1	0.244	—	10	0.285	—	10	0.409	—	10
10 2	0.279	200	200	0.320	210	190	0.444	150	170
10 3	0.321	—	120	0.362	—	110	0.486	—	100
10 4	0.371	—	0	0.412	—	0	0.536	—	0
10 5	0.428	180	240	0.469	170	230	0.593	—	220
10 6	0.493	260	280	0.534	280	270	0.658	220	250
10 7	0.564	—	100	0.605	—	100	0.729	—	90
10 8	0.644	—	50	0.685	—	50	0.809	—	50
10 9	0.730	—	70	0.771	—	70	0.895	—	70
10 10	0.824	—	50	0.865	—	50	—	—	—

On the basis of these observations a scheme for the distribution of the W atoms was suggested, having the symmetry $P2/m$ and giving concordance between calculated and observed F^2_{h0l} values of moderately high indices. These W coordinates could be improved from a few successive calculations of the projection $\rho(xz)$ of the electron density function. The final metal positions were settled from the cut $\rho(x\frac{1}{2}z)$. In this way the following arrangement of the W atoms was arrived at¹:

Cell content: 18 W

Space group: $C^1_{2h}-P2/m$

2 W ₁	in 2(<i>n</i>):	0.072	$\frac{1}{2}$	0.003
2 W ₂	in 2(<i>n</i>):	0.084	$\frac{1}{2}$	0.285
2 W ₃	in 2(<i>n</i>):	0.127	$\frac{1}{2}$	0.759
2 W ₄	in 2(<i>n</i>):	0.218	$\frac{1}{2}$	0.575
2 W ₅	in 2(<i>n</i>):	0.257	$\frac{1}{2}$	0.015
2 W ₆	in 2(<i>n</i>):	0.277	$\frac{1}{2}$	0.257
2 W ₇	in 2(<i>n</i>):	0.363	$\frac{1}{2}$	0.869
2 W ₈	in 2(<i>n</i>):	0.414	$\frac{1}{2}$	0.536
2 W ₉	in 2(<i>n</i>):	0.453	$\frac{1}{2}$	0.168

¹ Notations according to "International Tables for the Determination of Crystal Structures," Berlin 1935.

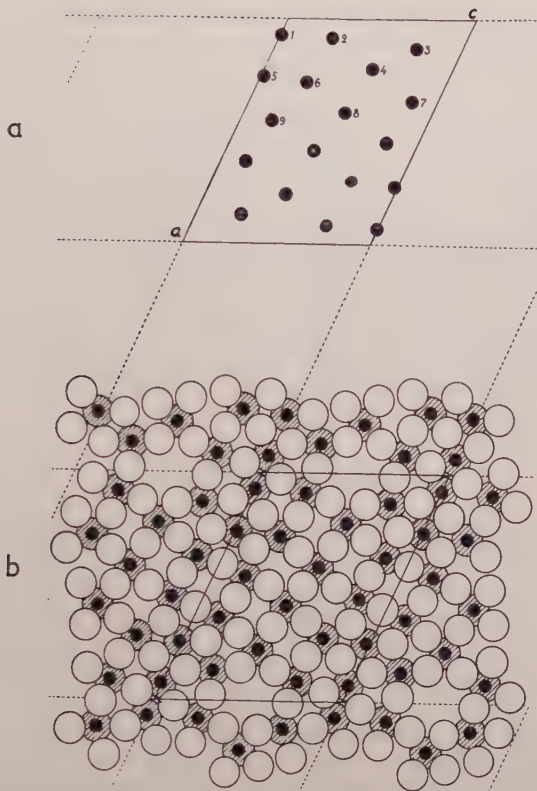


Fig. 2. Projection of the structure parallel to $[0\ 1\ 0]$. The atoms marked with lines are situated at $y = 0$, the other ones at $y = \frac{1}{2}$. The atoms at $y = 1$ are omitted. In a) are only the positions of the W atoms indicated, while b) shows the complete structure.

The positions of the W atoms within one unit cell are indicated in Fig. 2 a. In Table 1 structure factor values calculated on the basis of this distribution of the W atoms, the influence of the O atoms being neglected, are compared with the observed ones for a number of reflections. The agreement is not entirely perfect, but shows the structure to be essentially correct. The relative inaccuracy of the W coordinates — probably not exceeding $\frac{1}{2}$ p. cent — may among other things be due to cutting off effects.

The irregular distribution of the W atoms of the structure is remarkable. The W lattice contains spacious vacant channels around the lines $0\ y\ \frac{1}{2}$ whereas there is a pronounced concentration of W atoms between these channels (around the lines $0\ y\ 0$).

The distances between adjacent W atoms are of various lengths, but may be divided into three classes, *viz.* a) the very short distance of 2.60 Å between W_1 atoms related by the twofold axis in $0\ y\ 0$, b) the distances between W_5 and the five neighbouring W atoms in the plane $x\ \frac{1}{2}\ z$ being 3.31–3.44 Å, and c) all the remaining W–W distances, including those parallel to $[0\ 1\ 0]$, ranging from 3.62 to 3.96 Å.

a) The distance of 2.60 Å only slightly exceeds the shortest W-W distance of WO_2 (9) and thus indicates a tendency of the two W atoms to form a doublet. In the dioxide such W atoms belong to two WO_6 octahedra joined by sharing an edge.

b) The arrangement of five W atoms close to the corners of a regular pentagon with the W_5 atom situated in the centre is a very peculiar one. In the tetragonal potassium tungsten bronze (10) pentagons formed by W atoms occur but these figures are not centred. W-W distances of lengths comparable with those between W_5 and its five neighbours lack analogy in similar tungsten compounds hitherto known. But, they agree fairly well with the distances between the Mo atoms of MoO_6 octahedra joined by sharing edges in MoO_3 (8, 11) and in Mo_9O_{26} and Mo_8O_{23} (3).

c) These distances correspond to those calculated between W atoms belonging to WO_6 octahedra joined by sharing corners in WO_3 (8), in the cubic sodium tungsten bronze (12), and in the tetragonal potassium tungsten bronze (10).

Oxygen positions

As was pointed out in (1) the cell content of γ -tungsten oxide, calculated on the basis of the cell dimensions mentioned above, the density value 7.72 (2) and the formula $\text{W}_4\text{O}_{11}(\text{WO}_{2.75})$ is $4.5 \text{ W}_4\text{O}_{11} = \text{W}_{18}\text{O}_{49.5}$. Although it cannot be fully excluded either that the unit cell contains partially occupied oxygen positions or that this cell refers to a substructure of the heavy W atoms only, it seems less probable that this formula is correct as it corresponds to a number of O atoms per cell not being an integer. Nor is the phase analysis by means of powder photographs in full agreement with the formula W_4O_{11} , but indicates a composition slightly poorer in oxygen (1). As reliable data concerning the O content of the oxide were lacking and the ρ function did not show any maxima interpretable as due to O atoms, the possibility of deriving the O lattice from the observed W positions and reasonable interatomic distances was examined.

If the O lattice has the same symmetry as the W lattice, *viz.* $P2/m$, all the O atoms for space reasons must be situated in the mirror planes, *i. e.* have the y coordinate equal to 0 or $\frac{1}{2}$. The distance between adjacent W and O atoms may be about 1.9 Å and can hardly fall below 1.85 Å. It seems reasonable that 18 O atoms at $y=0$ are inserted midway between identical W atoms of two unit cells and thus have the same x and z coordinates as the corresponding W atoms. The O atoms at $y=\frac{1}{2}$ are likely to be situated close to the peripheries of circles with the radius 1.85 Å, drawn with the W positions as centres. If it is assumed that the O-O distances cannot be much shorter than 2.6 Å, there are only rather restricted areas left where O atoms may occur. In this way each of the W atoms indexed 1-4 and 6-9 will coordinate six O atoms to form a more or less deformed WO_6 octahedron. The W_5 atom will be surrounded by five O atoms at $y=\frac{1}{2}$. The pentagon formed by these atoms must, however, be less regular than the one corresponding to the five W atoms at $y=\frac{1}{2}$ environing W_5 as otherwise the arrangement would give by far too long W_5 -O distances. If four of the O atoms are brought nearer to W_5 and the remaining one is removed a little ways a plausible disposition will be obtained, the W_5 atom closely coordinating six O atoms but having one more O atom at a greater distance. For space reasons it seems most probable that O_{22} (*v. infra*) is the one not belonging to the WO_6 octahedron.

In this way the following arrangement of 49 O atoms compatible with the symmetry $P2/m$ is found to be plausible:

2 O ₁	in 2(m):	0.07	0	0.005
2 O ₂	in 2(m):	0.085	0	0.285
2 O ₃	in 2(m):	0.125	0	0.76
2 O ₄	in 2(m):	0.22	0	0.575
2 O ₅	in 2(m):	0.255	0	0.015
2 O ₆	in 2(m):	0.275	0	0.255
2 O ₇	in 2(m):	0.365	0	0.87
2 O ₈	in 2(m):	0.415	0	0.535
2 O ₉	in 2(m):	0.455	0	0.17
2 O ₁₀	in 2(n):	0.015	$\frac{1}{2}$	0.715
2 O ₁₁	in 2(n):	0.035	$\frac{1}{2}$	0.115
2 O ₁₂	in 2(n):	0.125	$\frac{1}{2}$	0.905
2 O ₁₃	in 2(n):	0.125	$\frac{1}{2}$	0.43
2 O ₁₄	in 2(n):	0.14	$\frac{1}{2}$	0.625
2 O ₁₅	in 2(n):	0.185	$\frac{1}{2}$	0.11
2 O ₁₆	in 2(n):	0.19	$\frac{1}{2}$	0.30
2 O ₁₇	in 2(n):	0.25	$\frac{1}{2}$	0.87
2 O ₁₈	in 2(n):	0.29	$\frac{1}{2}$	0.715
2 O ₁₉	in 2(n):	0.32	$\frac{1}{2}$	0.555
2 O ₂₀	in 2(n):	0.335	$\frac{1}{2}$	0.15
2 O ₂₁	in 2(n):	0.35	$\frac{1}{2}$	0.39
2 O ₂₂	in 2(n):	0.40	$\frac{1}{2}$	0.015
2 O ₂₃	in 2(n):	0.445	$\frac{1}{2}$	0.82
2 O ₂₄	in 2(n):	0.495	$\frac{1}{2}$	0.32
1 O ₂₅	in 1(h):	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$

The proposed structure is illustrated in Fig. 2 b. As the scattering power of the O atoms is so much less than that of the W atoms, it is not possible to verify the O arrangement from a comparison between observed and calculated structure factor values.

The appearance of a vector Oa in the Patterson projection $p(xz)$ (*cf.* Fig. 1), halving the vector OA is in accordance with the occurrence of a great number of W-O distances of this direction. A maximum halving the vector OE is much less pronounced which seems natural as the corresponding W-O distances are considerably spread about this direction.

The cell content $W_{18}O_{49} = WO_{2.72}$ is in excellent agreement with the observations mentioned above concerning the composition of the oxide. The complicated formula may seem a little strange but is not much more entangled than those derived for a couple of phases occurring in the system molybdenum-oxygen (3).

The arrangement of the O atoms is in fair agreement with the W-W distances of the structure (*v. supra*). The very short distance between the W_1 atoms related by the twofold axis in Oy 0 corresponds to two WO_6 octahedra with an elongated O-O edge in common. As in WO_2 this short W-W linkage is conjugated by two longer ones (W_1-W_5) between WO polyhedra sharing edges of normal lengths. The distances between W_5 and the remaining W neighbours at $y = \frac{1}{2}$ may as well be looked upon as corresponding to WO polyhedra joined by sharing edges.¹ All the

¹ This presupposes the O_{22} atom to be regarded as belonging to the O polygon of W_5 .

long W-W distances are associated with WO polyhedra with corners in common. The part of the structure exclusively consisting of WO₆ octahedra coupled together in this way is evidently, like WO₃, of a deformed D0₉-type.

The width of the channels around the lines $0\ y\ \frac{1}{2}$ is considerable. It may be that divers foreign substances can be inserted here.

SUMMARY

The crystal structure of γ -tungsten oxide has been investigated by means of X-rays. The positions of the W atoms have been settled. A probable arrangement of O atoms has been worked out from spatial considerations. In this way a cell content of W₁₈O₄₉ has been arrived at, corresponding to a composition of the oxide of WO_{2.72}. This is in fair agreement with analytical data previously reported and with phase analysis by means of powder photographs. The lattice is built up of WO₆ octahedra coupled together in an intricate way by sharing corners and edges. The structure is to some extent related to those of WO₂ and WO₃.

The author wishes to express his gratitude to Professor G. HÄGG for his encouraging interest in the investigation. He is also indebted to Mr. TOR LÖFGREN and Mr. BENGT LINDQVIST for their valuable assistance with the calculations. The investigation has been supported by grants, which are gratefully acknowledged, from the Scheele fund of the Royal Swedish Academy of Science and from the Swedish Natural Science Research Council.

Institute of Chemistry, University of Uppsala, January 1949.

REFERENCES. 1. G. Hägg and A. Magnéli, *Arkiv för Kemi etc.* 19 A, N:o 2. 1944. — 2. O. Glemser and H. Sauer, *Z. anorg. Chem.* 252, 144. 1943. — 3. A. Magnéli, *Acta Chem. Scand.* 2, 501. 1948. — 4. Chia-Si Lu, *Rev. Sci. Instr.* 14, 331. 1943. — 5. G. Hägg and T. Laurent, *J. Sci. Instr.* 23, 155. 1946. — 6. J. M. Robertson, *J. Sci. Instr.* 25, 28. 1948. — 7. *Z. Krist. Strukturbericht* 1928–1932. 1937. — 8. H. Bräkken, *Z. Krist.* 78, 484. 1931. — 9. A. Magnéli, *Arkiv för Kemi etc.* 24 A, N:o 2. 1946. — 10. —, *Arkiv för Kemi* 1, N:o 22. 1949. — 11. N. Wooster, *Z. Krist.* 80, 504, 1931. — 12. G. Hägg, *Z. phys. Chem. (B)* 29, 192. 1935.

Tryckt den 23 juni 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

On the methyl methanetrissulfonate

By EVALD SAMÉN

If electron-attracting atomic groups ($X = -\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_2\text{R}$) are introduced in methane, this causes as known an obvious effect on the proton mobility.

SCHWARZENBACH (1) has estimated the dissociation constant for methane to a value of 10^{-34} . Already the introducing of one nitro group is giving the formed compound (CH_3NO_2) an acid constant about 10^{-11} according to JUNELL (2), TURNBULL and MARON (3). The same value of magnitude is given too for the malononitrile $\text{CH}_2(\text{CN})_2$ (4). On basis of conductance measurements SAMÉN (5) has estimated the dissociation constant for bis-(methylsulfonyl)-methane to approximately 10^{-11} , while SCHWARZENBACH and FELDER (6) give an approximate value of 10^{-14} from titration curves. Hence compounds of the type CH_2X_2 are obviously acid. In CHX_3 the proton mobility is enormously increased. Three electron-attracting groups activate the hydrogen to an extremely high degree, and therefore nitroform $\text{CH}(\text{NO}_2)_3$ and cyanoform $\text{CH}(\text{CN})_3$ as known possess the character of strong acids. According to SAMÉN (5, 7) the trisulfonylmethanes $\text{CH}(\text{SO}_2\text{R})_3$ ($\text{R} = \text{alkyl}$) have the same strongly acid properties. The sulfone group, however, has less tendency than the nitro and cyano groups to undergo polarization. SO_2OR belongs to the same type of electron-attracting groups. ARNDT and MARTIUS (8) have investigated methyl methionate and have found that this ester possesses acid character.

In connection with earlier investigations on the acidity of trisulfones and their behavior to bromine, it could be of decided interest to do analogous investigations on an ester of methanetrissulfonic acid $\text{CH}(\text{SO}_2\text{OR})_3$. Such an ester has apparently not been prepared previously. BAGNALL (9) tried to prepare the ethyl ester by action of ethyl iodide on the silver salt of methanetrissulfonic acid, but failed. The present author has prepared the analogous methyl ester by reaction in benzene solution. The ester obtained, which is crystallized, appears to possess strongly acid properties. It dissolves rather easily in water, where it is gradually hydrolysed. In hot water the hydrolysis is rapid. Immediately after the ester is dissolved, the compound will probably be present as carbanions, which are changed by the hydrolysis into the ordinary negative ions of the sulfonic acid.

The behavior of the ester towards bromine calls to mind strongly that of the trisulfonylmethanes. If a newly prepared solution of the ester in water is mixed with bromine water, a white precipitate is formed, which gradually is dissolved. Closer investigations show the occurrence of "positive" bromine. The bromine derivative momentarily liberates iodine from a solution of potassium iodide. This reaction can therefore be used for determination of the bromo-ester. On the other hand if the ester is dissolved in glacial acetic acid, to which bromine is added, the bromine color does not disappear immediately. The bromination reaction there-

fore seems to run more slowly in glacial acetic acid than in water, a case that is probably connected with the unequal basicity of the two solvents.

The high bromination velocity of the ester is remarkable, while on the contrary the trissulfonic acid itself reacts exceedingly slowly. In connection with earlier investigations on the bromination velocities (10, 11) it was found that the bromine consumption after four days amounts only to 1 % in the reaction between potassium methanetrissulfonate and bromine in hydrobromic acid at 25° C.¹ BACKER and KLAASSENS (12) however have preparatively shown that the methanetrissulfonic acid is relatively quickly brominated at 150° C. A plausible explanation for this

may be that in the negative anion $\text{CH}-\text{SO}_2\text{O}^-$ the tendency to deliver proton from CH is exceedingly slight. On the other hand in the ester, the electron-attracting effects of the SO_2OCH_3 groups are strongly pronounced.

Experimental

Silver methanetrissulfonate. There are several methods for the preparation of the methanetrissulfonic acid. An appropriate process has been stated by v. PECHMANN and MANCK (13), and this method has in part been perfected by BACKER (14). By an interesting reaction involving potassium bisulfite and potassium cyanide the potassium salt of amino-methionine is prepared, which is transferred to the diazo compound. By the action of the salt upon potassium bisulfite potassium methanetrissulfonate is obtained. After the liberated acid has been treated with silver carbonate, the silver salt of the trissulfonic acid is at last obtained. The author has followed BACKER's method. It is more advisable, however, to keep the temperature not higher than 30° C in the reaction between the diazo compound and potassium bisulfite.

Methyl methanetrissulfonate. 11.5 g (0.02 mole) of the water-free, by 180° C dried silver salt and 9 g of methyl iodide in 50 ml of benzene was heated to gentle boiling under a reflux condenser for eight hours. After the silver iodide had been removed, the reaction product was allowed to crystallize from the benzene solution. Yield, 1.8 g of ester.

The compound was recrystallized from boiling benzene. It separated in long, fine needles. M. P. 110–111° C (corr.) The ester is sparingly soluble in benzene, ether and chloroform, more soluble in water. By keeping the compound in open air, it gradually adsorbs water and liquefies.

Anal. Subs., 36.08 mg: 21.41 mg CO₂, 10.78 mg H₂O.

C₄H₁₀O₉S₃ (298.3) calc. C 16.11 H 3.34

found C 16.19 H 3.34.

Hydrolysis of the methyl ester. The hydrolysis is rapid in hot water. 68.09 mg of ester was dissolved in 10 ml of water and was boiled for one minute. For neutralization 9.28 ml of 0.0734 N NaOH was demanded. Eq.w. = 99.9. Calc. 99.4.

Preliminary measurements show that 0.01 M solutions of the ester in water are half hydrolysed after about twenty hours at room-temperature.

¹ Unpublished experiments by E. Samén.

Reactions of the ester with bromine. 0.6 g of ester was dissolved in 10 ml of ice-cooled water and an equivalent quantity of bromine, dissolved in a little cold water was added. A white precipitate immediately was formed. The product was filtered off and dried in a vacuum dessicator. Yield, 0.4 g. The compound was recrystallized from dry boiling benzene, from which colorless crystals were obtained, which began to melt at 140° C with decomposition (blackening and gas generating).

Anal. Subs., 40.92 mg: 19.20 mg CO₂, 8.73 mg H₂O.

C₄H₉O₉BrS₃ (377.2) calc. C 12.74 H 2.41
found C 12.80 H 2.39.

The bromo derivative liberates iodine from potassium iodide instantly and quantitatively. 33.79 mg of the compound was weighed in a weigh glass and brought into a flask with ground-glass stopper. After this a solution of about 0.1 g of potassium iodide in 10 ml of water was added. The bromo derivative was rapidly dissolved and after the addition of 2 ml of 1 N sulfuric acid, was titrated with 17.38 ml of 0.01029 N sodium thiosulfate. This corresponds to 1.996 equivalents of iodine per mole bromo derivative.

A slight quantity of bromine in glacial acetic acid was added to a solution of the ester in the same solvent. The bromo color disappeared only gradually. On adding a few drops of water the color vanished immediately.

SUMMARY

Methyl methanetrisulfonate has been prepared. M.P. 110–111° C.

The ester appears to possess strongly acid properties and reacts with bromine instantly.

The bromo derivative liberates iodine rapidly and quantitatively. This reaction can therefore be used for determining the bromo compound.

This investigation was partly supported by a grant from *Statens naturvetenskapliga Forskningsråd*, which is gratefully acknowledged.

Laboratory of Organic Chemistry, University of Uppsala, March 1949.

REFERENCES: (1) **Schwarzenbach**, Z. physik. Chem. A, 176, 133 (1936). — (2) **Junell**, Diss., Uppsala 1935. — (3) **Turnbull** and **Maron**, J. Am. Chem. Soc. 65, 212 (1943). — (4) **Branch** and **Calvin**, The Theory of Organic Chemistry, New York 1945, p. 269. — (5) **Samén**, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. Bd 14 B, N:o 28 (1941). — (6) **Schwarzenbach** and **Felder**, Helv. Chim. Acta 27, 1701 (1944). — (7) **Samén**, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. Bd 15 B, N:o 15 (1942). — (8) **Arndt** and **Martius**, Ann. 499, 228 (1932). — (9) **Bagnall**, J. Chem. Soc. 75, 278 (1899). — (10) **Ramberg** and **Samén**, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. Bd 11 B, N:o 35 (1934). — (11) **Ramberg** and **Samén**, *Ibid.* Bd 11 B, N:o 40 (1934). — (12) **Backer** and **Klaassens**, Rec. trav. chim. 49, 1045 (1930). — (13) **v. Pechmann** and **Manck**, Ber. 23, 2374 (1895). — (14) **Backer**, Rec. trav. chim. 49, 1107 (1930).

Tryckt den 27 juni 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Über die aus Glucose durch Reversion gebildeten Saccharide

Von KARL MYRBÄCK, MAJ HAMMARSTRAND und HENRY GELINDER

Mit 3 figuren im Text

In einer konzentrierten Lösung von Glucose in starker Salzsäure tritt eine Bildung höherer Saccharide ein (1, 2). EMIL FISCHER gewann aus solchen „Reversionsprodukten“ in geringer Ausbeute ein reduzierendes Disaccharid in Form des Osazons (3). FISCHER nannte das Disaccharid Isomaltose, weil es seiner Ansicht nach der Maltose nahe stehen musste ohne jedoch damit identisch zu sein.

H. BERLIN (4) gibt an, unter den Reversionsprodukten Gentiobiose (6- β -D-Glucosido-D-glucose) gefunden zu haben. Gross können aber die Gentiobiosemenngen auf alle Fälle nicht sein, da bei der Reversion ein beträchtlicher Drehungsanstieg eintritt.

A. GEORG (5) hat in einer kurzen Mitteilung ohne Wiedergabe experimentellen Materials angegeben, dass die Fischersche Isomaltose eine 6- α -Glucosidoglucose ist. In früheren Arbeiten (6, 7) aus diesem Laboratorium konnte gezeigt werden, erstens dass nicht nur Disaccharide sondern auch höhermolekulare Saccharide gebildet werden, zweitens dass die Disaccharidfraktion zum grossen Teil 6- α -Glucosidoglucose, daneben aber auch andere Disaccharide enthält. Gärversuche zeigen eindeutig, dass Maltose nicht oder nur in verschwindend kleinen Mengen entsteht. Die isolierte Disaccharidfraktion die selbstverständlich wegen Verluste während der Fraktionierung nur einen Teil der tatsächlich entstandenen darstellt, enthielt etwa 55% 6- α -Glucosidoglucose.

Die Bezeichnung Isomaltose ist in der älteren Literatur vielfach für allerlei unbekannte Saccharide missbräuchlich benutzt worden. Bezgl. der Konstitution der Fischerschen Isomaltose sind auch verschiedene Vorschläge gemacht worden. Es kann aber jetzt als festgestellt betrachtet werden, dass die Fischersche Isomaltose als Hauptbestandteil die 6- α -Glucosido<1,5>-glucose<1,5> enthält. Der Name Isomaltose sollte nur im Falle dieses Disaccharids zur Anwendung kommen.

In der älteren Literatur taucht immer wieder die Behauptung auf, die Fischersche Isomaltose sei durch Hydrolyse von Stärke erhältlich. Meistens waren die isolierten „Isomaltosepräparate“ weit von einheitlich. In einigen Fällen ist möglich, dass die isolierten Produkte eher Reversionsprodukte als wahre Hydrolyseprodukte der Stärke waren. Die sog. Amylobiose, die PRINGSHEIM (8) durch Behandlung von Stärke mit konzentrierter Salzsäure gewonnen hat, kann wohl zum Teil Hydrolyseprodukte der Stärke enthalten, muss aber jedoch auf alle Fälle beträchtliche Mengen von Reversionsprodukten enthalten haben (9, 10). Immerhin kann man, wenn man Stärke unter solchen Bedingungen hydrolysiert, dass keine Reversion eintritt, Disaccharidpräparate isolieren, die nicht mit Maltose identisch sind. AHLBORG

und MYRBÄCK (11) konnten zeigen, dass diese Präparate hauptsächlich Isomaltose (in dem oben definierten Sinne) enthalten. Da die Stärke etwa 4% 1,6- α -glucosidische Bindungen enthält, und da diese langsamer hydrolysiert werden als die 1,4- α -glucosidischen Bindungen (Maltosebindungen), so ist ja die Möglichkeit einer Isomaltosebildung während der Hydrolyse gegeben, und zwar nicht nur bei der Säurehydrolyse sondern auch im Falle der enzymatischen Verdauung der Stärke.

H. FRAHM (12) hat der Reversion der Glucose eine eingehende Untersuchung gewidmet. Er zeigt u. a. dass der Vorgang völlig reversibel ist. Lässt man z. B. eine 4 M Lösung von Glucose in 40,8% HCl das Gleichgewicht erreichen, und verdünnt man dann die Lösung mit 40,8% Salzsäure auf das doppelte Volumen, so steigt der Reduktionswert der Lösung allmählich auf den Wert, den man in einer von Anfang an 2 M Lösung von Glucose in 40,8% HCl erhält. FRAHM schliesst hieraus, dass das Massenwirkungsgesetz für die Berechnung der Gleichgewichte anwendbar ist. Durch Reduktionsbestimmungen stellt er den „Glucoseumsatz“ fest; daraus lässt sich die Glucosekonzentration und die Konzentration der Reversionsprodukte berechnen. Ausser Oligosaccharide können bei der Reversion auch Anhydride durch Beteiligung der reduzierenden Gruppe entstehen. Für den Fall der ausschliesslichen Bildung von Oligosacchariden mit dem durchschnittlichen Polymerisationsgrad n und für den Fall der ausschliesslichen Bildung von Anhydriden mit dem Polymerisationsgrad n leitet FRAHM dann Ausdrücke der Gleichgewichtskonstanten ab. Durch Prüfung der Konstanz der k -Werte für verschiedene Werte von n , findet er, dass der wahrscheinliche Polymerisationsgrad zwischen 2 und 3 liegt. Da seine Berechnungen weiter zu zeigen scheinen, dass bei höheren Anfangskonzentrationen der Glucose nicht reduzierende Anhydride im grossen Ausmasse gebildet werden, so schliesst FRAHM, dass von reduzierenden Oligosacchariden eigentlich nur Disaccharide gebildet werden.

Zu diesen Berechnungen muss aber folgendes angeführt werden: Erstens sind sämtliche k - bzw. k' -Werte der Tabelle 3 der zitierten Arbeit falsch berechnet.¹ Die richtig berechneten k -Werte sind 4 mal so gross und die k' -Werte 9 mal so gross wie die in der Tabelle angeführten; dies spielt aber für die wesentliche Frage keine Rolle. Aber zweitens können folgende Einwände gemacht werden: Der Glucoseumsatz wird durch Gärungsversuche in dem von Iterson-Kluyverschen Gärapparat bestimmt. Die gemessene Kohlensäureentwicklung wird in Glucose umgerechnet. FRAHM betrachtet also als selbstverständlich, dass in den Mischungen von Glucose und Reversionsprodukten nur die Glucose vergärbar ist. Wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde (6, 7) und wie ausserdem aus den hier unten mitzuteilenden Versuchen hervorgeht, ist dies keineswegs der Fall. Es mag sein, dass es Presshefen gibt, die unter den infragekommenden Zuckern nur Glucose vergärt. Ob dies für die von FRAHM angewendete Presshefe der Fall war, weiss niemand. Auch in unseren Versuchen vergärt die Glucose sehr viel schneller als die vergärbaren Reversionsprodukte, aber bei einer Gärzeit von 24 Stunden, wie sie von FRAHM angewendet wurde, kann ein beträchtlicher Teil der Kohlensäureentwicklung von anderen Zuckern als Glucose herrühren. Noch bedenklicher erscheint aber die von FRAHM ausgeführte Berechnung der „Wasserkonzentration“ beim Gleichgewicht: „Die im Gleichge-

¹ Die auf S. 626 der Arbeit gegebenen Formeln der Oligosaccharid- bzw. Anhydridbildung sind richtig. Bei der Berechnung der k - bzw. k' -Werte der Tabelle hat aber FRAHM offenbar die Formel $k = \frac{1}{n} \cdot \frac{[A]^{n-1} (1 - \alpha)^n}{a \cdot [H_2O]^{n-1}}$ statt der richtigen Formel $k = \frac{n \cdot [A]^{n-1} (1 - \alpha)^n}{a \cdot [H_2O]^{n-1}}$ benutzt. Entsprechendes gilt für die Berechnung der k' -Werte.

wicht vorhandene Wassermenge $[H_2O]$ ergibt sich aus dem Litergewicht der Lösung nach Abzug der darin enthaltenen Anfangsmenge Glucose (Summe der Grundmolaritäten) und der bekannten Menge Salzsäure, zusätzlich der bei der Reaktion entstehenden verhältnismässig geringen Wassermenge, die aus der Zusammensetzung der Reversionsprodukte berechnet werden kann.“ Die Grösse $[H_2O]$ der Formel bedeutet aber gar nicht die in dieser Weise berechnete Anzahl Wassermoleküle pro Liter Lösung sondern die Wasseraktivität, die in 40,8% HCl, die ausserdem bis über 50% Glucose enthält, gar nicht mit der „Wasserkonzentration“ identisch ist. Wenn man beachtet, dass der Wasserdampfdruck einer 40,8-prozentigen Salzsäure weniger als 10% von dem des Wassers (beide bei 20°) ist (13), und dass ausserdem die hohe Glucosekonzentration die Wasseraktivität noch vermindert, so lässt sich sagen, dass die von FRAHM berechneten Werte von $[H_2O]$ jede Bedeutung entbehren.¹

Aus mehreren Gründen müssen wir also die von FRAHM angestellten Berechnungen über die Gleichgewichte und die dabei existierenden Komponenten als für das Problem bedeutungslos betrachten. Die Versuche und Berechnungen von FRAHM sagen nichts aus über die wahrscheinlichen Polymerisationsgrade der entstehenden Saccharide oder über das Verhältnis Oligosaccharide : Anhydride.

Tatsächlich wurde in früheren Arbeiten aus diesem Laboratorium gezeigt (6), dass bei der Reversion konzentrierter Glucoselösungen beträchtliche Mengen höherer Saccharide entstehen. Offenbar kann man nicht ohne weiteres das Molekulargewicht aus dem Reduktionswert berechnen, da ja die Anwesenheit von Anhydriden gar nicht ausgeschlossen ist. Deshalb wurde das Molekulargewicht noch durch Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit ermittelt. Bei einfacher Fraktionierung der Reversionsprodukte (nach Entfernung der vergärbaren Zucker durch Presshefe) konnten wir Fraktionen gewinnen, die ein mittleres Molekulargewicht von mindestens 800 zeigten, und die also sicher Pentasaccharide enthielten. Da die Reduktionsbestimmungen eher ein niedrigeres als ein höheres Molekulargewicht andeuteten, so lässt sich schliessen, dass keine grossen Mengen von Anhydriden anwesend sein konnten.

Wir haben jetzt neue Versuche über die Reversion der Glucose in starker Salzsäure angestellt und dabei versucht, gewisse Anhaltspunkte für die Konstitution der gebildeten höheren Saccharide zu gewinnen.

1. Verlauf der Reversion

Je 10 g Glucose wurden in 40 ml Salzsäure gelöst und bei +2° gehalten. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reduktion nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL bestimmt und als Glucose berechnet. Die scheinbare Glucosemenge ist in der Tabelle 1 als % der ursprünglichen angegeben. Nach Abschluss der Versuche wurden die Lösungen mit je 250 ml absolutem Alkohol versetzt, die Niederschläge abfiltriert und mit Alkohol und schliesslich Äther von Wasser und Salzsäure befreit. Die Mutterlaugen wurden mit je 250 ml Äther gefällt und die Niederschläge in derselben Weise behandelt.

¹ Die Glucose-HCl-Lösungen bereitet FRAHM durch Mischung gewogener Mengen von Glucose und 40,8 % HCl. Die HCl-Konzentration, in Mol./Liter Lösung, ist also in den Versuchen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen gar nicht konstant!

Tabelle 1

	Zeit Stunden	Scheinbarer Glucosegehalt %	Eigenschaften der gefällten Präparate				
			Nr	Fällungs- mittel	g	Polymerisa- tionsgrad	$[\alpha]_D^{20^\circ}$
Versuch 1. 37 % HCl.	18	82,8	1	Alkohol	0,7	3,1	+94,6°
	24	79,7	2	Alkohol + + Äther	1,5	2,5	+90,6°
	47	77,7					
	67	70,6					
	90	69,8					
	96	69,3					
	113	68,7					
	137	68,7					
	185	67,7					
Versuch 2. 40 % HCl.	18	71,0	3	Alkohol	0,9	3,4	+96,0°
	24	71,0	4	Alkohol + + Äther	1,8	3,0	+93,9°
	40	71,0					
	64	66,4					
	113	64,8					

Die Versuche zeigen, dass die Reversion schnell eine Gleichgewichtslage erreicht. In den beiden Versuchen war der durchschnittliche Polymerisationsgrad dann etwa 1,5. Bei den Fällungen wird die Hauptmenge der unveränderten Glucose abgetrennt, so dass die ausgefällten Fraktionen selbstverständlich einen höheren Polymerisationsgrad haben. Die Vergärbarkeit der gefällten Präparate 1–4 durch Presshefe wurde untersucht. Parallelversuche mit Glucose + Maltose. Gärkurven in der Abb. 1. Die Kurven zeigen, dass die Präparate 5–10% Glucose enthalten und dass keine nennenswerten Mengen von Maltose anwesend sein können, so dass angenommen werden kann, dass die sonst vergärbaren etwa 20% der Präparate aus Isomaltose bestehen. Die ausgefällten Präparate bestehen zum grössten Teil aus Trisacchariden aber selbstverständlich sind ausser Isomaltose und Glucose auch höhere Saccharide, vielleicht auch Anhydride, anwesend. Die spezifische Drehung ist auf die bei der Totalhydrolyse entstehenden Glucosemengen berechnet.

Im *Versuch 3* wurden je 50 g Glucose in 50 ml Salzsäure gelöst (Volumen 83 ml). Salzsäurekonzentration und Temperatur wurden variiert. Tabelle 2.

Tabelle 2

40 % HCl, +2°		37 % HCl, +2°		33 % HCl, +2°		37 % HCl, +20°		37 % HCl, +30°	
Stunden	% Glucose	Stunden	% Glucose	Stunden	% Glucose	Stunden	% Glucose	Stunden	% Glucose
5	95,9	5	94,7	5	99,9	17	58,1	3	61,2
9	92,1	9	92,3	9	94,7	21	57,4	5	53,5
24,5	85,2	24	85,6	24	93,4	26	53,0	7,5	48,2
73	69,2	73	71,9	73	86,5	44	50,7	26	47,7
97	65,9	97	65,9	97	81,8				
121	60,0	121	62,3	121	78,1				
145	57,4	144	60,3	144	76,8				
171	56,8	171	57,6	172	74,4				

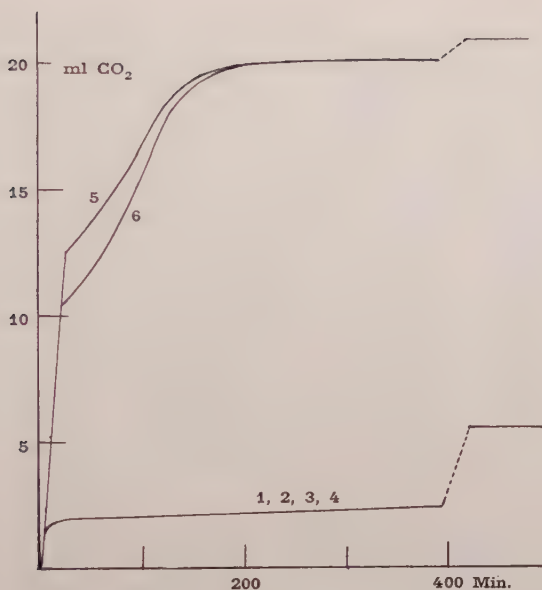


Abb. 1. Kurve 1: 98 mg Präparat 1
 » 2: 101 » » 2
 » 3: 108 » » 3
 » 4: 118 » » 4
 » 5: 58 » Glucose + 42 mg Maltose
 » 6: 70 » » + 30 » »

Die Lösung in 40% Salzsäure verhält sich also im grossen und ganzen wie die in 37% Säure. In der 33-prozentigen Säure ist dagegen die Umwandlungsgeschwindigkeit sehr stark herabgesetzt und die Ausbeute an höheren Sacchariden wahrscheinlich auch kleiner. Dass die Umwandlungsgeschwindigkeit bei höherer Temperatur stark vergrössert sein soll, ist ja selbstverständlich. Möglicherweise geht auch die Umwandlung etwas weiter als bei $+2^{\circ}$; gross sind die Unterschiede aber nicht. Die wirkliche Gleichgewichtslage ist ja sehr schwer festzustellen, da allmählich der Zucker zerstört wird und die Lösungen verfärbt werden.

Die im Versuch 3 erhaltenen Lösungen der Reversionsprodukte wurden in je ein Liter absoluten Alkohols eingegossen und die Niederschläge wie oben behandelt. Aus den Mutterlaugen wurden mit je 500 ml Äther weitere Niederschläge erhalten. Durch Gärungsversuche wurde der Glucosegehalt sämtlicher Niederschläge ermittelt, so dass die Werte der Ausbeuten, des Polymerisationsgrades und der spezifischen Drehung korrigiert werden konnten. Tabelle 3.

Die Unterschiede im Polymerisationsgrad der verschiedenen ausgefällten Reversionsprodukte sind nicht sehr gross. Die spezifische Drehung variiert demgemäss nur wenig. Dagegen sind die Ausbeuten an fällbaren Reversionsprodukten sehr verschieden. Die Versuche bei höherer Temperatur ergeben die höchsten Ausbeuten, entweder weil die grössere Reaktionsgeschwindigkeit eine bessere Annäherung an die Gleichgewichtslage ermöglicht hat, oder weil sich die Gleichgewichtslagen mit der Temperatur verschieben. In Versuchen bei derselben Temperatur ($+2^{\circ}$) ist die Ausbeute in der 40-prozentigen Säure die grösste.

Tabelle 3

	Fällung mit	Ausbeute		P	$[\alpha]_D^{20^\circ}$	% Glucose	Korrigiert		
		g	%				P	$[\alpha]_D^{20^\circ}$	% Ausbeute
40 % HCl, 2°	Alkohol	25,7	54	2,3	88,5°	10	2,45	92,5°	49
	A + Äther	1,3		2,6	91,7°	7	2,70	94,6°	
37 % HCl, 2°	Alkohol	14,9	35	2,5	79,1°	12	2,70	82,2°	31
	A + Äther	2,5		2,3	85,5°	11	2,45	89,7°	
33 % HCl, 2°	Alkohol	16,8	38	2,1	70,5°	17	2,33	74,0°	31
	A + Äther	2,2		1,8	72,1°	26	2,08	78,9°	
37 % HCl, 20°	Alkohol	33,9	74	3,2	93,2°	7	3,37	96,1°	68
	A + Äther	3,0		2,3	87,0°	12	2,48	91,9°	
37 % HCl, 30°	Alkohol	34,5	79	2,6	102,6°	11	2,80	108,5°	70
	A + Äther	4,9		2,4	91,6°	13	2,61	97,5°	

Im Versuch 4 wurden 200 g Glucose in 200 g (168 ml) 37 % Salzsäure aufgelöst: Volumen 305 ml. Die Lösung wurde bei +2° gehalten. Zu verschiedenen Zeiten wurden je 50 ml (32,8 g Glucose entsprechend) entnommen und mit je 500 ml absolutem Alkohol gefällt. Die Niederschläge wurden wie oben behandelt. (Der nach einem Tag isolierte Präparat wird mit I bezeichnet usw.) Tabelle 4.

Tabelle 4

Behandlung, Tage	Ausbeute, g	Scheinbarer Polymerisationsgrad	% Glucose	Mittlerer Polymerisationsgrad (korr.)
1	7,0	1,87	34	2,3
2	14,0	2,01	24	2,3
3	15,0	2,16	26	2,6
4	16,0	2,27	21	2,6
5	20,4	2,43	18	2,7
6	21,7	2,50	13	2,8

Aus dem Versuch 4 geht hervor, dass der mittlere Polymerisationsgrad der Reversionsprodukte mit der Zeit recht wenig zunimmt; dagegen steigen die Ausbeuten an fällbaren Reversionsprodukten sehr stark an. Die Produkte scheinen hauptsächlich Di- und Trisaccharide zu enthalten. Trisaccharide scheinen von Anfang an gebildet zu werden.

2. Die Konstitution der Reversionsprodukte

Durch Gärversuche kann der Glucosegehalt der Reversionsprodukte bestimmt werden; der Verlauf der Gärkurven hat aber auch sonst grosse Bedeutung, u. a. für die Beantwortung der Frage, ob bei der Reversion Maltose entsteht, wie z. B. von

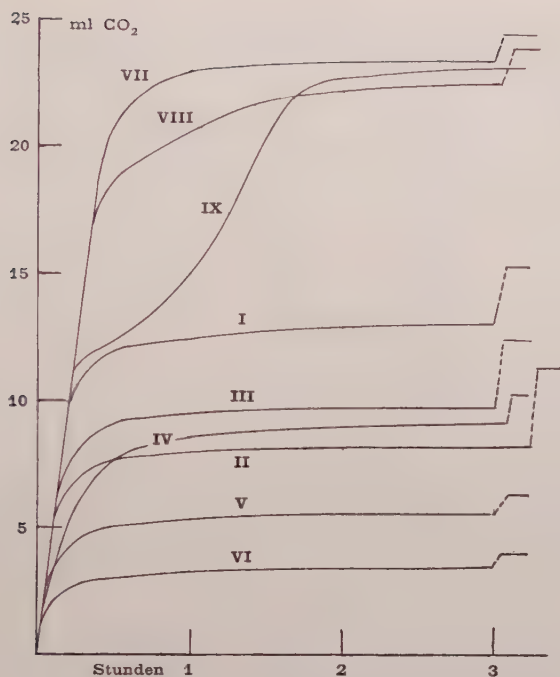


Abb. 2. Kurve I: 212 mg Präparat I
 » II: 216 » » II
 » III: 217 » » III
 » IV: 267 » » IV
 » V: 204 » » V
 » VI: 214 » » VI
 » VII: 107 » Glucose
 » VIII: 91 » » + 13 mg Maltose
 » IX: 50 » » + 50 » »

O. v. FRIEDRICHS (14) behauptet worden ist. Die von uns angewendete Presshefe vergärt wie schon erwähnt Glucose ohne jede Induktionsperiode mit grosser Geschwindigkeit; die Maltosegärung fängt dagegen erst nach einer gewissen Induktionsperiode an, und die Geschwindigkeit der Maltosegärung ist niedriger als die der Glucosegärung, jedoch viel höher als die Gärgeschwindigkeit der sonst vergärbaren Stoffe. Es besteht also keine Schwierigkeit die Anwesenheit nennenswerter Mengen von Maltose nachzuweisen. In der Abbildung 2 findet man die Gärkurven der ausgefällten Reversionsprodukte sowie die Kurven für reine Glucose und eine Mischung von viel Glucose und wenig Maltose. Der Unterschied zwischen der Kurve VII einerseits und den Kurven VIII und IX andererseits ist sehr deutlich. Die Kurven I–VI zeigen, dass bei der Reversion der Glucose in konzentrierter Salzsäure keine Maltose oder höchstens nur ganz kleine Mengen davon entstehen.

Die aus dem Versuch 3 stammenden, ausgefällten Reversionsprodukte wurden in Wasser gelöst und mit 50 g frischer Presshefe behandelt. Nach Abschluss der Gärung wurde filtriert und die Lösung auf 200 ml eingengt.

Tabelle 5

Zeit, Minuten	Reversionsprodukte		Maltose	
	mg »Glucose«	k. 10^3	mg »Glucose«	k. 10^3
0	105	—	449	—
5	115	28	—	—
15	—	—	562	(84)
30	176	30	689	110
45	205	31	744	103
60	238	34	801	109
90	—	—	862	119
120	304	31	—	—
180	356	33	—	—
240	389	33	—	—
∞	440	—	900	—

Geschwindigkeit der Säurehydrolyse. Die Lösung wurde in der Verdünnung 1 : 25 in 1 n Schwefelsäure bei 100° hydrolysiert und die Geschwindigkeitskonstante nach der monomolekularen Formel ausgerechnet. Parallelversuch mit Maltose. Tabelle 5.

Wir finden also in Übereinstimmung mit älteren Versuchen, dass die Reversionsprodukte viel langsamer hydrolysiert werden als die Maltose. Die Geschwindigkeitskonstanten verhalten sich wie etwa 1 : 3. Daraus geht ja hervor, dass die Glucosidbindungen in den Reversionsprodukten anderer Art als die Glucosidbindung der Maltose sein müssen. Man beachte, dass die Hydrolysekonstante der Isomaltose etwa ein Drittel von der der Maltose ist (15).

Die Reduktionsbestimmungen vor und nach vollständiger Säurehydrolyse zeigt ein Molekulargewicht von etwa 680 an, dies selbstverständlich unter der Voraussetzung dass keine nicht reduzierenden Stoffe (Anhydride) darin vorkommen. Wir haben versucht dies wie früher in der Weise festzustellen, dass wir das Molekulargewicht auch nach einer anderen Methode bestimmt haben. Bestimmungen der Geschwindigkeit der freien Diffusion in Öholmischen Apparaten gaben, nach der Formel von EULER berechnet, die Werte $M = 680$ bzw. 700. Zwei Parallelversuche mit Maltose gaben die Werte $M = 370$ bzw. 380. Wenn auch die Molekulargewichtsbestimmungen durch Messung der freien Diffusion keine sehr grosse Genauigkeit besitzen, so geht jedoch hervor, dass das Molekulargewicht 650–700 betragen muss. Da das aus der Reduktion berechnete Molekulargewicht 680 ist, so muss geschlossen werden, dass in dem Präparat keine allzu grossen Mengen von Anhydriden anwesend sein können. Die Kettenlänge der hier untersuchten Fraktion der Reversionsprodukte scheint also rund 4 zu sein.

Methylierung. 66 g Reversionsprodukte in 150 ml Wasser wurden unter Wasserstoff mit 75 ml Dimethylsulfat und 60 ml 40% Natronlauge bei 40° vormethyliert (16). Nach Stehen über Nacht wurde mit 210 ml Dimethylsulfat und 435 ml Lauge bei 70° weiter methyliert. Nach Stehen über Nacht wurden die ausgefallenen Salze abgesogen und das Filtrat mit Chloroform erschöpfend extrahiert. 61 g Substanz mit 44,1% Methoxyl wurden erhalten. Durch nochmalige Methylierung der extrahierten Wasserlösung liessen sich noch 6 g Substanz gewinnen. Die Gesamtmenge

Tabelle 6

Extrakt Nr	Total- menge, g	% Methoxyl	Tetramethyl- glucose, g	Trimethyl- glyucose, g
1	2,62	52,5	2,62	0
2	0,82	51,5	0,74	0,08
3	0,46	51,2	0,37	0,09
4	0,30	49,0	0,20	0,10
5	0,19	48,8	0,12	0,07
6	0,13	48,0	0,10	0,03
	4,52		4,15	0,37

des methylierten Produktes wurde noch fünf mal in derselben Weise methyliert, wonach 48 g Substanz mit 48,0% Methoxyl übrig waren. 40 g davon wurden zweimal mit je 100 g Methyljodid und 78 g Silberoxyd unter Rückfluss und CaCl_2 -Verschluss auf dem Wasserbade methyliert (17). Erhalten wurden schliesslich 29 g Substanz mit 50,0% Methoxyl. Für ein vollmethyliertes Tetrasaccharid berechnet man den Methoxylgehalt 50,3%. Die optische Drehung des Methyläthers war $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +94,2^\circ$ (1% in Wasser).

Hydrolyse des Methyläthers. 10,94 g Substanz wurden zur Hydrolyse mit 200 ml 2 n HCl unter Rückfluss 12 Stunden gekocht. Die Drehung änderte sich dabei nur wenig. Die Lösung wurde abgekühlt, mit BaCO_3 neutralisiert und sechs mal mit je 150 ml Chloroform extrahiert. Die gemischten Chloroformextrakte wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Chloroform abdestilliert. Die Rückstände waren gelblichweiss und schön kristallisiert. Der Methoxylgehalt wurde bestimmt und daraus der Gehalt an Tetra- und Trimethylglucose berechnet: Tabelle 6.

Die extrahierte Wasserlösung wurde auf dem Wasserbade zum Trockene eingengt und der Rückstand zweimal mit Äther ausgekocht. Die Ätherextrakte wurden getrocknet und der Äther abgetrieben. Die Rückstände waren farblose, hochviscöse Flüssigkeiten. Der Methoxylgehalt war 40,4 bzw. 37,2%. Da Trimethylglucose 41,8% Methoxyl enthält, so ergibt sich unter der Annahme, dass die Substanz Tri- und Dimethylglucose enthält, ein Gehalt von 2,95 g Trimethyl- und 0,16 g Dimethylglucose.

Der Rückstand der Ätherextraktion wurde zweimal mit Azeton ausgekocht. Insgesamt wurden 0,50 g Substanz mit 29,5% Methoxyl (wahrscheinlich Dimethylglucose) gewonnen. Schliesslich wurden die Rückstände mit Methanol ausgekocht; die Extrakte wurden mit Schwefelsäure von Ba befreit und eingengt: 1,52 g Substanz mit 48,2% Methoxyl. Der hohe Methoxylgehalt weist auf einen hohen Gehalt von Tetramethylglucose hin. Nimmt man an, dass ausser Tetramethylglucose nur noch Trimethylglucose anwesend ist, so berechnet sich, dass mit Methanol 0,91 g Tetramethyl- und 0,61 g Trimethylglucose extrahiert worden waren.

Insgesamt erhielten wir also aus 10,94 g (0,0127 Mol.) methyliertem Tetrasaccharid 5,06 g (0,0212 Mol.) Tetramethylglucose, 3,93 g (0,0177 Mol.) Trimethylglucose und 0,66 g Substanz mit niedrigerem Methoxylgehalt, wahrscheinlich Dimethylglucose. Die Ausbeute an methylierten Hydrolyseprodukten ist etwa 84%. Die Verluste dürften besonders im Falle der Dimethylglucose beträchtlich sein.

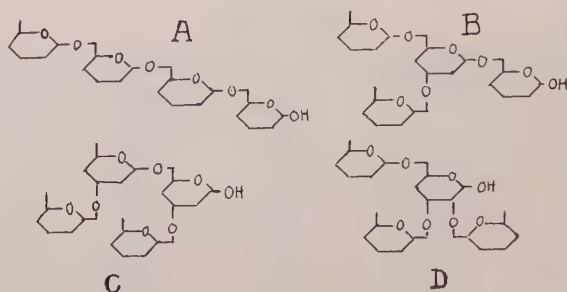


Abb. 3.

Da aus dem obigen hervorgeht, dass pro Molekül methylierten Tetrasaccharids 1,67 Mol. Tetramethylglucose und etwa 1,40 Mol. Trimethylglucose hervorgegangen sind, so ist zu schliessen, dass die durch die Reversion gebildeten Tetrasaccharide wenigstens zum Teil verzweigte Ketten haben müssen. Erst dadurch erklärt sich, dass die Ausbeute an Tetramethylglucose 1 Mol. übersteigt. Wenn die Moleküle verzweigt sind, so müssen darin mindestens zwei verschiedene Arten von Glucosidbindungen vorkommen. Aus den älteren, oben zitierten Arbeiten ist zu schliessen, dass 1,6-Bindungen relativ reichlich vorhanden sind. Man könnte sich z. B. vorstellen, dass die isolierte Tetrasaccharidfraction ein Gemisch wäre von den in der Abbildung 3 schematisch wiedergegebenen Sacchariden. Aus diesen müssten nach Methylierung und Hydrolyse die in der Tabelle 7 angegebenen Hydrolyseprodukte entstehen.

Da 1,6-Bindungen aller Wahrscheinlichkeit nach häufig vorkommen, so haben wir untersucht, ob die Trimethylglucosefraction ausschliesslich aus 2, 3, 4-Trimethylglucose besteht. Dies ist dadurch möglich, dass man nach OLDHAM und RUTHERFORD (18) die Anwesenheit des primären Hydroxyls untersucht. Die Trimethylglucosefraction wurde mit Methanol, 1% HCl enthaltend, glucosidiert, das Methanol abgetrieben und der Rückstand bei 0,02 mm Hg destilliert, wobei das Trimethylmethylglucosid als wasserhelle, viscöse Flüssigkeit erhalten wurde. Diese wurde in Pyridin gelöst und drei Tage bei Zimmertemperatur mit p-Toluolsulfochlorid behandelt. Reichliche Kristallisation trat ein. Die Mischung wurde dann mit Benzol und Wasser behandelt, bis sich alles gelöst hatte. Die Benzolschicht wurde mit starker Salzsäure und danach mit Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Eine halb feste Masse blieb übrig. Die Substanz wurde in Azetonlösung bei 100° mit NaJ nach CRAMER und PURVES (19) behandelt, das Azeton abdestilliert, die Substanz mit Chloroform und Wasser behandelt, die Chloroformlösung getrocknet und eingengt. Das ölige Produkt, ein Gemisch

Tabelle 7

Substanz	Tetramethylglucose	2,3,4-Trimethylglucose	Andere Trimethylglucosen	Dimethylglucose	Monomethylglucose
A	1 Mol.	3 Mol.	—	—	—
B	2 »	1 »	—	1 Mol.	—
C	2 »	—	1 Mol.	1 »	—
D	3 »	—	—	—	1 Mol.

Tabelle 8

Verarbeitete Menge Trimethyl- methylglucosid, g	Jodhydrin+ p-Toluolsul- fonylester, g	AgJ g	% 2,3,4-Tri- methyl-methyl- glucosid
2,400	2,416	0,650	42
1,650	1,420	0,382	42
2,270	2,210	0,537	38

des 6-Jodhydrins des 2,3,4-Trimethyl-methylglucosids mit p-Toluolsulfonsäureester anderer Glucoside, wurde während zwei Stunden mit Silbernitrat in Azetonitril auf dem Wasserbade behandelt. Das Azetonitril wurde verjagt, der Rückstand getrocknet, mit Benzol extrahiert, wieder getrocknet und schliesslich in der Wärme mit Salpetersäure behandelt. Das Silberjodid wurde dann in der üblichen Weise behandelt und gewogen: Tabelle 8.

Wir finden also, dass die Trimethylglucosefraktion zu rund 41% aus 2,3,4-Trimethylglucose besteht. Andere Trimethylglucosen müssen also in beträchtlicher Menge vorhanden sein. Es sei daran erinnert, dass bei der Untersuchung der bei der Reversion entstehenden Disaccharidfraktion die Trimethylglucosefraktion zu etwa 55% aus 2,3,4-Trimethylglucose bestand. Auch in diesem Falle waren also andere Trimethylglucosen anwesend. Die Gärversuche zeigen, dass Maltose nicht oder nur in sehr kleinen Mengen vorhanden sein kann. Es wäre also zu schliessen, dass in der Disaccharidfraktion ausser der Isomaltose noch Saccharide wie die 2- oder 3-Glucosidoglucose vorkommen, dies unter der Voraussetzung, dass keine Verschiebung der Sauerstoffbrücken während der Reversion stattfindet. Da kein Disaccharid mit 1,4-Bindung gebildet wird, so dürfte angenommen werden können, dass dies auch für die höheren Saccharide gilt. Trotzdem sind sehr viele Möglichkeiten der Isomerie vorhanden, wovon einige typische Beispiele in der Abbildung wiedergegeben sind. Die gefundene Zusammensetzung der Hydrolyseprodukte des methylierten Tetrasaccharids entspricht einer Mischung der Typen A, B und C.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Reversion von Glucose in starker Salzsäure entstehen ausser Disaccharide vom Typus der Isomaltose auch höhere Saccharide. Berechnungen über die bei der Reversion gebildeten Produkte wie die von FRAHM ausgeführten sind aus mehreren Gründen unzuverlässig. Eine Fraktion der aus Glucose entstehenden Reversionsprodukte mit einem mittleren Polymerisationsgrad von etwa 4 wurde durch Methylierung usw. näher charakterisiert. 1,6-Bindungen kommen darin in beträchtlicher Zahl vor aber auch andere Bindungen wie 1,2- und/oder 1,3-Bindungen, während 1,4-Bindungen wahrscheinlich fehlen.

LITERATUR. 1. E. Grimaux und L. Lefèvre, C. R. Acad. Sci. 103, 146 (1886). — 2. F. Musculus und A. Meyer, *ibid.* 92, 528 (1881). — 3. E. Fischer, Ber. dtsh. chem. Ges. 23, 3687 (1890); 28, 3024 (1895). — 4. H. Berlin, J. Am. chem. soc., 48, 1107 (1926). — 5. A. Georg, C. R. Séances Soc. phys. Hist. Natur. Genève 47, 94 (1930). — 6. K. Myrbäck, Svensk kem. tid. 53, 67 (1941). — 7. K. Myrbäck, *ibid.* 53, 264 (1941). — 8. H. Pringsheim und Mitarbeiter, Ber. dtsh. chem. Ges. 57, 884 und 1581 (1924); 59, 1001 (1926). — 9. P. Karrer, Z. physiol.

Chem. 148, 62 (1925). — 10. K. Myrbäck, Svensk kem. tid. 50, 185 (1938). — 11. K. Ahlborg und K. Myrbäck, Biochem. Z. 308, 187 (1941). — 12. H. Frahm, Ber. dtsh. chem. Ges. 74, 622 (1941). — 13. Landolt-Börnstein: Tabellen, HW, II, 1397, Eg. I, 760-762. — 14. O. v. Friedrichs, Arkiv kemi, mineral. geol. 5, Nr 2 und 4 (1913). — 15. K. Ahlborg und K. Myrbäck, Biochem. Z., 308, 187 (1941). — 16. W. N. Haworth and G. C. Leitch, J. chem. soc. 113, 188 (1918). — 17. T. Purdie and J. C. Irvine, J. chem. soc. 83, 1030 (1903). — 18. J. W. H. Oldham and J. K. Rutherford, J. am. chem. soc. 54, 366 (1932). — 19. F. B. Cramer and C. B. Purves, J. Am. chem. soc. 61, 3458 (1939).

Tryckt den 27 juni 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Influence de quelques facteurs sur la formation des réticulocytes

Par NORA BARGONI¹

La concentration des réticulocytes² dans le sang subit de très grandes variations, dépendentes des conditions physiologiques et pathologiques de l'organisme animal, variations qui sont causées par des hormones, des vitamines et des autres ergones, formés dans le corps même ou additionnés par injection ou per os. Bien que le nombre des réticulocytes, qu'on trouve dans le sang, indique l'émission de ces cellules par la moelle osseuse, ce nombre est un indicateur très sensible de beaucoup de réactions biochimiques qui se passent dans l'animal.

Dans une mémoire précédente³ il fut constaté que le nombre des réticulocytes du rat normal, ca 1,5 % des globules rouges, est réduit dans les rats porteurs des sarcomes transplantés, à 1,3-1/4 de la valeur normale. La question, quelle est la substance qui se forme dans le sarcome et qui exerce cet effet diminuant sur le nombre des réticulocytes, est d'un intérêt essentiel pour la biochimie des tumeurs, et nous y reviendrons dans un travail suivant.

En premier lieu la connaissance des vitamines et des hormones déterminants la formation des globules rouges contenant des noyaux, nous intéresse en ce qui concerne leurs actions anti-anémiques. De ce point de vue nous avons étudié l'action de l'acide folique, prouvée déjà, comme un des composants anti-anémiques actives dans la thérapie du foie, introduite par les découvertes de MURPHY, de MINOT et de WHIPPLE.

Par le moyen des différents régimes et sous l'action de l'histidine et de sulfoguanidine, qui supprime la formation de l'acide folique dans les intestins, on a réussi à produire une carence folique produisant une anémie macrocytaire et hyperchrome, ressemblante à l'anémie pernicieuse. Pourtant il n'y a pas de doute, que l'acide folique n'est qu'un seul des facteurs anti-anémiques dont la carence cause l'anémie pernicieuse.

On sait que — en outre des facteurs spécifiques anti-anémiques — la formation des cellules rouges est influencée par des vitamines de croissance, axérophthol, riboflavine, acide ascorbique, par la présence du fer et du cuivre, etc.

Le nombre des réticulocytes, versé par la moelle osseuse dans le sang, est le résultat des deux réactions:

de la *déstruction* et de la
synthèse de ces cellules.

¹ Bourse d'étude A. A. U. W. Crusade International de la I. F. U. W.

² Nous désignons ici par le terme «réticulocytes» les cellules rouges, caractérisées par la coloration avec bleu crésole, d'après la méthode standardisée.

³ N. BARGONI, Arkiv f. Kemi, 1, Nr. 17 (1949).

La destruction des réticulocytes commence avec la disparition des noyaux. Quant à la synthèse il faut accentuer le rôle dominant qu'on doit attribuer aux acides nucléiques.

D'autre part, l'augmentation des réticulocytes est sans doute aussi le résultat des excitations nerveuses par différents ergones, l'histamine, l'adrénaline et par des autres substances qui causent le «depressor effect» des extraits des nerfs et de la cervelle. Dans les cas où le nombre total des érythrocytes n'est pas altéré, l'influence des substances injectées doit être attribuée aux excitations nerveuses de la moelle osseuse.

Recherches personnelles

La méthode utilisée pour la détermination du nombre des réticulocytes était la même que nous avons décrite dans la mémoire précédente.

Nos rats normaux et nos rats cancéreux (porteurs d'un sarcome transplanté, dérivant d'un sarcome produit par injection de benzopyrène) ont reçu un régime libre, non standardisé, contenant tous les composants et toutes les vitamines d'une nourriture naturelle. Les rats privés de vitamine A avaient reçu le régime par lequel, dans cet Institut, nous préparons les rats pour l'étude de la vitamine A par la méthode curative. (Régime S II + D):

Caséine.....	100 g	Sels: NaCl.....	400 g
Amidon.....	250 g	KH ₂ PO ₄	1 600 g
Sels.....	25 g	CaH ₄ (PO ₄) ₂	1 200 g
Levure.....	200 g	MgSO ₄	400 g
Matières gras.....	60 g	Lactate de Ca.....	400 g
Jus d'orange.....	10 ml	FeCl ₃	40 g
KJ.....	50 mg	CuSO ₄	4 g

Les substances étudiées étaient introduites par injection intramusculaire.

Résultats

Mes expériences récentes confirment les valeurs moyennes obtenues pour le nombre des réticulocytes, calculé en % de la concentration totale des érythrocytes; pour

Rats normaux.....	1-2 (1,0-2,0)
Rats normaux, en carence de vitamine A...	0,5 (0,3-0,7)
Rats porteurs d'un sarcome transplanté.....	0,4 (0,2-0,6)

Quant à ces valeurs il faut signaler, que les variations sont considérables, comme on voit de la table précédente et qu'on trouve aussi des variations avec l'âge des animaux:

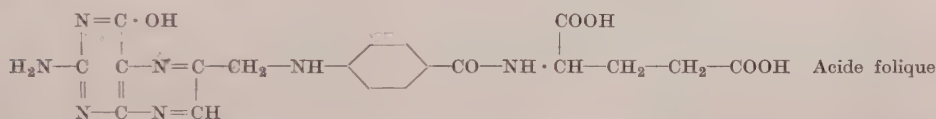
Tableau 1

Poids des rats	Sexe	Âge	Érythrocytes	% réticulocytes
63 g	♂	2 mois	4 960 000	1,7
61 g	♂	2 mois	4 310 000	2,5
218 g	♂	8 mois	5 840 000	1,2
217 g	♂	8 mois	6 240 000	1,4

Beaucoup des expériences chez l'homme, chez les cobayes et chez les rats ont démontré que l'acide ascorbique a une grande influence sur la formation des réticulocytes. On suppose, que cet effet a lieu principalement dans la moelle osseuse, produisant une thrombocytopoïèse augmentée et une augmentation de l'albumine du sérum. On a constaté une relation directe entre le dosage de l'acide ascorbique et le niveau érythrocytaire. Le mécanisme de cette influence n'est pas encore éclairci; il s'agit d'une coopération entre les vitamines A et C.¹ Bien que seule la carence en vitamine C ne peut pas produire des anémies, cette vitamine prend toujours part dans le développement de la condition anémique et dans l'abaissement du niveau réticulocytaire du sang.

Acide Folique

Quelques années après l'introduction de la thérapie hépatique de l'anémie pernicieuse par MURPHY, MINOT et WHIPPLE, TSCHESCHE et H. J. WOLF² ont injecté des ptérides dans des jeunes rats rendus anémiques par le régime de ROMINGER et BOMSKOV, et ils ont réussi d'arrêter la chute des érythrocytes et même de hausser le niveau réticulocytaire du sang. En suite il fut démontré, que l'acide folique et le facteur B₁₂, contenant C₀, sont des dérivées de *ptérine*, dont la constitution fut éclairci par H. WIELAND.



Je donne quelques déterminations préliminaires faites avec des rats dont le niveau réticulocytaire est très bas; j'ai choisi des rats privés de vitamine A.

Tableau 2
Rats privés de vitamine A.

Poids et sexe	γ acide folique	Temps d'incubat.	Érythrocytes	% réticulocytes
56 g ♂	5	20 h	6 120 000	3
40	10	5 h	6 000 000	2

La formation d'acide folique dans les bactéries des intestins est inhibée par la présence de sulfonamides. D'après une hypothèse de TSCHESCHE (1) cet antagonisme est causé par un blocage de l'acide p-aminobenzoïque, un des composants de l'acide folique, qui est supposé de réagir avec l'aldéhyde ptéroïque.

En relation avec cette hypothèse de TSCHESCHE, qui fut vérifiée par des recherches avec *B. Coli*, nous avons étudié l'effet simultané de l'acide folique et de la streptomycine sur le nombre des réticulocytes:

¹ Voir, EULER et KLUSMAN, Arkiv f. Kemi 14 A (1933). — J. MAYER et W. A. KREHL, Arch. of Biochem. 16, 313 (1947).

² R. TSCHESCHE u. H. J. WOLF, Z. physiol. Chem. 248, 24 (1937).

³ TSCHESCHE et coll., Z. f. Naturforsch. 2 b, 244 (1947), 3 b, 298 (1948). — Voir aussi: WEIGAND, MÖLLER u. WACKER, Z. f. Naturforsch. 3 b, 299 (1948).

Tableau 3

Rats normaux.

Poids des rats	γ acide folique	Streptomycine	Temps d'incubat.	Érythrocytes	% réticulo-cytes
56 g	5	—	20 h	6 120 000	3
72 g	5	50 γ	20 h	6 480 000	0,4

Dans la cellule normale l'acide folique agit comme facteur de croissance. Il est très intéressant que cette vitamine s'est montrée comme antagoniste des cellules cancéreuses. Ces résultats, publiés par des auteurs Américains (3) furent confirmés récemment par LETTRÉ (4).

Nos résultats, obtenus avec des rats porteurs d'un sarcome (benzopyrène) étaient les suivants:

Tableau 4

Rats porteurs de sarcome (Benzpyrène).

Poids des rats et sexe	Poids des sarcomes	γ acide folique	Streptomycine	Temps d'incubation	Érythrocytes	% réticulo-cytes
422 g ♂	172 g	5	—	20 h	5 840 000	11
355 g ♂	156 g	5	50 γ	20 h	5 460 000	12

L'acide folique est un ptéroylglutamate. Cette substance, qui est déjà produite par voie synthétique, est active comme facteur anti-anémique; cependant ce monoglutamate n'est point le seul composant du foie qui possède des facultés anti-anémiques. En 1945 un facteur fut isolé de la levure ayant un poids moléculaire 3 fois plus haut que la vitamine B₁₂, nommé vitamine conjugate. Dans la levure l'acide ptéroïque (acide ptéroilaminobenzoïque) est combiné non pas avec une seule, mais avec 7 molécules d'acide glutaminique. L'acide folique donne aussi des complexes, ou conjuguates, avec un nombre différent de molécules d'acide glutaminique et avec d'autres composants.

Chez l'homme normal le nombre des globules rouges n'est pas augmenté par l'acide folique et le même résultat négative est obtenu chez les rats normaux. La carence d'acide folique ne produit pas chez les rats de symptômes caractéristiques de carence, ce qui est causé par le fait que l'acide folique peut être synthétisé par la flore bactérienne des intestins.

Histamine

D'après plusieurs observations faites pendant les dernières années, on peut supposer que la composition du sang est réglée par le système nerveux central. Pour connaître cette régulation il est important d'étudier les variations des ergones dans la cervelle des animaux normaux et pathologiques.

De ce point de vue EULER et MALMBERG ont observé la relation entre le dosage de l'acide ascorbique et la concentration de cette vitamine dans la cervelle, et ces relations ont été confirmées par PLAUT et BÜLOW. Par telles influences nerveuses les effets que les vitamines et les autres facteurs de croissance exercent sur le nombre des réticulocytes, peuvent être cachés. L'histamine semble jouer un rôle très important parmi les substances qui servent comme médiateurs des actions nerveuses sur la formation des globules rouges et des réticulocytes.

On connaît l'effet abaissant de l'histamine sur la pression du sang et sur la dilatation des capillaires.

Les résultats obtenus avec histamine, injectée intramusculairement dans les rats privés de vitamine A, furent les suivants:

Tableau 5

Rats privés de vitamine A.

Poids des rats	Histamine inj.	Temps d'incubat.	Érythrocytes	% réticulocytes
56 g	—	—	7 350 000	0,2
74 g	1 mg	4 h	6 810 000	1,5
70 g	1 mg	4 h	6 580 000	0,6
76 g	100 γ	18 h	5 660 000	7,0
74 g	100 γ	18 h	5 420 000	5,0
63 g	1 mg	18 h	6 240 000	8,0
87 g	1 mg	18 h	6 080 000	4,0

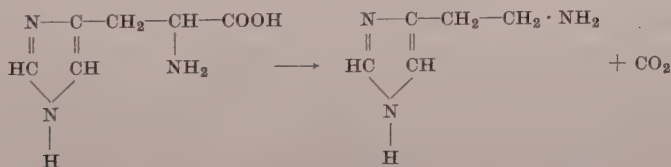
L'effet de l'injection est nul pendant les premières heures. Après 18 heures nous trouvons le nombre des réticulocytes fortement augmenté au-dessus de la valeur des rats normaux.

Histidine

L'histidine est reconnue depuis longtemps comme un des acides-aminés essentiels; elle est donc indispensable pour la croissance normale des cellules.

Par hydrolyse enzymatique l'histidine est décomposée en différents composants. En relation avec l'action de l'acide folique, il est important de signaler que l'histidine donne naissance à la formation de l'acide glutaminique. D'autre part on connaît une chaîne de réactions conduisant de l'histidine à l'acide urique et aux bases pyrimidiniques.

L'histidine est facilement hydrolysée formant histamine:



En accord avec la vitesse de cette hydrolyse on trouve la même augmentation des réticulocytes observée après l'injection et l'incubation de l'histamine:

Tableau 6

Rats privés de vitamine A.

Poids des rats	Histidine inj.	Temps d'incubat.	Érythrocytes	% réticulocytes
56 g	—	—	7 350 000	0,2
79 g	1 mg	5 h 30'	6 430 000	0,1
83 g	1 mg	5 h 30'	5 720 000	0,2
86 g	1 mg	24 h	5 730 000	9,0
65 g	1 mg	18 h	6 240 000	8,0
87 g	1 mg	18 h	6 080 000	4,0

Stockholm, Université, Institut de recherches en Chimie organique.

Tryckt den 29 juni 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Hexosamine in the sea-urchin egg jelly coat: a misinterpretation of the method of Elson and Morgan

By ERIK VASSEUR and JANIS IMMERS

When a jelly-coat solution of the sea-urchin egg comes into contact with sperm of the same species it shows physiological properties identical with fertilizin, the sperm-activating and sperm-agglutinating factor of "egg-water". Therefore, chemical analyses of the jelly substance should give interesting information concerning the mechanism of fertilizin-action. MONROY and RUFFO (1) report the isolation from sea-urchin sperm of a hyaluronidase-like principle which has a liquefying action on the jelly coat. Thus, the composition of this coat might be assumed to be similar to hyaluronic acid, but no hexuronic acid has been found in the jelly (2, 3), and the colour reaction for hexosamine is indeed very weak (2), corresponding, for instance, to 1.6–5 per cent glucosamine in *Strongylocentrotus purpuratus* (3, 4). Instead, the jelly has been shown (2) to consist of about 20 per cent protein-like material and of about 80 per cent polysaccharide, esterified by one sulphuric acid group (5) per monosaccharide residue. The polysaccharide has been shown (6) to consist of galactose in *Echinus esculentus* and *Brissopsis lyrifera* (7), fucose in *Echinocardium cordatum*, fucose and galactose in *Strongylocentrotus droebachiensis*, and fucose and glucose in *Paracentrotus lividus*, fucose being the dominating component in these two latter species.

We have been able to show that the weak colour for hexosamine obtained on sea-urchin jelly hydrolysate according to the method of ELSON and MORGAN (8), must be referred to a reaction of the carbohydrates with the amines, amino acids, and ammonium salts of the jelly hydrolysate. Contrary to glucosamine, a mixture of carbohydrates and amines etc. also gives a red colour with Ehrlich's reagent after treatment with a sodium carbonate solution which does not contain any acetylacetone, but the colour is more intense when treated with alkaline acetylacetone. Owing to this difference in reaction, a carbohydrate and amine mixture may be distinguished from real hexosamine, e.g. 2-amino-glucose.

Very probably the reducing group of the carbohydrate reacts with the amino group to form a derivative of e.g. 1-amino-glucose. This compound has already been shown by ELSON and MORGAN (8) to give an identical colour reaction as glucosamine with Ehrlich's reagent. Another conception of the mechanism of this reaction is the condensation of the *aldehydo* form of the carbohydrate with the amino group to form a Schiff's base. This is supported by the following facts.

Of the amino acids, lysine and ornithine give by far the strongest colour, glycine, arginine, and asparagine giving a much weaker coloration, whereas all the other amino acids tested (alanine, leucine, valine, serine, threonine, cystine, methionine,

phenylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine, aspartic acid, and glutamic acid) do not give any colour when tested separately with carbohydrate. A colour intensity intermediate between ornithine and glycine is obtained with β -alanine. This indicates that the ω -amino group has a decidedly stronger tendency to react than the α -amino group. The carbon chain length of the amino acid is also of indubitable significance for the colour development. Very probably, this depends on the electron attracting action of the carboxyl on the ω -amino group, which becomes less and less pronounced as the carbon chain length is increased. This interpretation is supported by the fact that hydroxylamine-HCl does not give any colour, whereas methylamine-HCl gives a colour reaction of the same strength as lysine and ornithine. The colour with ammonium salts is less pronounced and develops at a slower rate. On the other hand, dimethylamine-HCl and trimethylamine-HCl do not produce any colour after this alkaline treatment with carbohydrate. This demonstrates that the amino group must be unsubstituted in order to give the reaction. It seems therefore probable that the reaction implies a condensation of the Schiff's base type. A more complete account of this subject will be published soon.

Experimental

The jelly-coat substance to be analysed was hydrolysed for 7 hours with 2 *N* hydrochloric acid in a Hysil test-tube (150 $\times$ 15 mm), provided with a tied stopper and immersed in a vigorously boiling water bath. The hydrolysate was filtered through a Jena 3G3 glass filter and most of the hydrochloric acid removed by evaporation *in vacuo*. The residue was dissolved in distilled water, neutralised with sodium hydroxide to pink colour with phenolphthalein and diluted in concentrations ranging from 20 to 40 mg per ml.

In a Hysil test-tube (150 $\times$ 15 mm), marked to 5 ml, 0.5 ml sample (hydrolysate, glucosamine solution, or sugar and amino acid mixture; pH about 8.5) was mixed with 0.5 ml *M* sodium carbonate or with 0.5 ml of a freshly prepared solution of acetylacetone in sodium carbonate (0.1 ml acetylacetone in 5.0 ml *M* sodium carbonate). The mixture was heated in the stoppered tube for 20 minutes in a vigorously boiling water bath, then cooled and 2 ml 95 per cent ethanol added, and the contents mixed. To this mixture was added 0.5 ml of Ehrlich's reagent (0.8 ml *p*-dimethylamino-benzaldehyde in 30 ml 95 per cent ethanol plus 30 ml concentrated hydrochloric acid, sp. gr. 1.19) and then ethanol to the 5 ml mark. The solution was thoroughly mixed and the colour measured after 40 minutes with a Klett-Summerson photoelectric colorimeter with the green filter No. 54 and at varying intervals with a Beckman spectrophotometer model DU at wavelengths 400 to 600 μ , slit width 0.04 mm. The colour intensity was not affected if the addition of the Ehrlich's reagent was delayed for 2, 30, 60, or 90 minutes.

Four different mixtures of galactose and amino acids etc. (Table 1) were analysed for hexosamine in the same manner as the hydrolysates and the glucosamine solutions. They are synthetic, but rather incomplete hydrolysates, based on the values for carbohydrate and amino acids as obtained with jelly substance (see 2, table 6). The percentage of glycine is not based on quantitative determinations. The value for ammonium chloride is calculated from the figures for ammonium-nitrogen.

The values for "hexosamine" obtained with jelly hydrolysates are about 0.8 per cent in *Echinus esculentus* jelly substance, 1.0 per cent in *Echinocardium corda-*

Table 1

	Percentage in jelly substance	Mixture			
		1	2	3	4
		mg in 0.5 ml			
Galactose.	45	2.25	2.25	2.25	2.25
Lysine.	1.6	0.08	0.08	0.08	0.08
Arginine.	1.7		0.085	0.085	0.085
Valine.	8.2				0.41
Iso-leucine.	1.7				0.085
Threonine.	1.5				0.075
Glycine.	2.0		0.10	0.10	0.10
Ammonium chloride.	5.8			0.29	0.29
Total	67.5	2.23	2.515	2.805	3.375
	100	5.00	5.00	5.00	5.00
"Glucosamine" per cent		1.29	1.70	1.72	1.69

tum, and 1.7 per cent in *Strongylocentrotus droebachiensis*. KRAUSS (3), with the modification of PALMER, SMYTH, and MEYER (9), found 1.6 per cent in *S. purpuratus* "fertilizin" (= jelly-coat substance).

The values for the synthetic hydrolysates (mixtures 1 to 4) compared with the values for the genuine hydrolysates, as well as the density curves, demonstrate that the colour obtained with these latter hydrolysates depends, for by far the greatest part, on an interaction of the carbohydrates with the amino acids, ammonium salts, and amines of the hydrolysates. The comparison of the colour strengths as obtained with the mixtures 1 to 4 and the hydrolysates, indicates that the amino acids which do not form any colour, nevertheless compete for the carbohydrate with the colour-producing amino acids, thus lowering the "hexosamine" value. Another possible explanation of this colour-diminishing effect might be found in the extraordinary pH-dependency of the reaction, inasmuch as, the addition of an excess of amino acids would reduce the buffer capacity of the sodium carbonate solution, thus lowering the pH and changing the colour intensity. In any case, the evidence for the total absence of 2-amino-hexose in the jelly substance seems to be firmly established.

This conclusion is further supported by analyses on jelly hydrolysate with paper chromatography, since no spot in the positions of glucosamine and chondrosamine was obtained after treatment with acetylacetone-potassium hydroxide and Ehrlich's reagent (7).

SUMMARY

The positive colour reaction for hexosamine obtained with hydrolysate of sea-urchin egg jelly substance does not depend on the actual presence of *e.g.* 2-amino-glucose, but originates from an interaction of the carbohydrates with the amino acids, amines, and ammonium salts in the jelly hydrolysate.

A positive, but weaker reaction is obtained with jelly hydrolysate also in absence of acetylacetone, thus making possible the discrimination of a carbohydrate and amine mixture from real hexosamine.

This work has been supported by grants from von Beskows stipendiefond, the doktorandstipendium of the Swedish Government, and the Rockefeller Foundation.

From Wenner-Grens Institute for Experimental Biology, University of Stockholm.

References: 1. **Monroy, A.**, and **Ruffo, A.**, *Nature* 159, 603 (1947); **Ruffo, A.**, and **Monroy, A.**, *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 20, 253 (1947). — 2. **Vasseur, E.**, *Acta Chem. Scand.* 2, 900 (1948). — 3. **Krauss, M.**, *Biol. Bull.* 96, 74 (1949). — 4. **Tyler, A.**, *Physiol. Revs.* 28, 180 (1948). — 5. **Vasseur, E.**, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* 25 B, No. 6 (1947). — 6. **Vasseur, E.**, and **Immers, J.**, *Arkiv Kemi* 1, No. 6 (1949). — 7. **Vasseur, E.**, and **Immers, J.**, unpublished experiments. — 8. **Elson, L. A.**, and **Morgan, W. T. J.**, *Biochem. J.* 27, 1824 (1933). — 9. **Palmer, J. W.**, **Smyth, E. M.**, and **Meyer, K.**, *J. Biol. Chem.* 119, 491 (1937).

Tryckt den 28 juni 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Oxydo-Reduktions-Reaktionen an Endiolen und an Dichlorphenol-Indophenol

Von HANS VON EULER und HANS HASSELQUIST

Das gegenseitige oxydoreduktive Verhältnis gewisser Stoffpaare wird bestimmt durch ihre Oxydo-Reduktions-Potentiale und durch die Geschwindigkeit, mit welcher jede der beiden Komponenten in Richtung auf den oxydoreduktiven Ausgleich reagieren kann. Sind die Oxydo-Reduktions-Potentiale bekannt, so kann man — wenigstens in gewissen Fällen — aus der Reaktionsgeschwindigkeit Schlüsse auf die Struktur der reagierenden bzw. reaktionsvermittelnden Molekülarten ziehen.

Oxydo-Reduktions-Potentiale sind durch die grundlegenden Untersuchungen von MANSFIELD W. CLARK¹, L. MICHAELIS² und durch neuere Messungen von R. WURMSER, KEILIN, BRDIČKA u. a. in gewissem Umfang bezgl. Oxydo-Reduktions-Indikatoren und bezgl. einiger biochemisch wichtiger Systeme³ bekannt geworden. Systematische Untersuchungen über die gegenseitige Oxydierbarkeit und Reduzierbarkeit von Stoffpaaren liegen aber noch in geringer Anzahl vor.

Was die in diesem Institut studierten Reduktone bzw. Endiole betrifft, so haben Messungen von WURMSER⁴, MARTIUS, BRDIČKA zu Potentialwerten für Ascorbinsäure, Triose-Redukton, Dioxyaceton geführt. Das Oxydo-Reduktions-Potential des Dichlorphenol-Indophenols (Tillman's Reagenz, TR) ist in seiner Abhängigkeit von der Acidität von CLARK gemessen worden.

Zu Studien über Reduktone und Endiole haben wir die Reaktion zahlreicher Stoffe mit dem TR als Test verwendet. Im Verlauf dieser Studien hat sich die Frage nach den dabei auftretenden Gleichgewichten ergeben. In Zusammenhang mit diesen Untersuchungen, welche in verschiedener Richtung weiter ausgedehnt und auch theoretisch eingehender behandelt werden sollen, wurden auch Versuche über die Reduktionswirkung des Leuko-Dichlorphenol-Indophenols angestellt. In dieser Hinsicht liegen bis jetzt nur wenige Erfahrungen vor und auch an dem so oft verwendeten Methylenblau sind solche Versuche nur in geringem Umfang und nicht systematisch ausgeführt worden; nur über das Gleichgewicht zwischen Methylenblau und Leuko-Methylenblau (Methylen-weiss) liegt eine Untersuchung von W. M. CLARK vor.

¹ MANSFIELD CLARK, Studies on Oxidation-Reduction, I-X. Hygienic Labor. Bulletin No. 151 (1938).

² L. MICHAELIS, Die Wasserstoffionen-Konzentration. Berlin, Springer 1929.

³ Siehe auch J. LEHMANN, Skand. Archiv f. Physiol. 59 (1930).

⁴ R. WURMSER, Journ. de Chim. Phys. 31, 419 (1934). — 33, 101 (1936). — Siehe auch MARTIUS, Z. physiol. Chem. 240, 195 (1936).

Versuche mit Leuko-Dichlorphenol-Indophenol

Wir haben zu unseren orientierenden Versuchen Lösungen von TR verwendet, in welchen der blaue Indikator bei alkalischer Reaktion durch Zusatz von Reduktion gerade bis zum Umschlagspunkt entfärbt worden war. Zu der unter Stickstoff gehaltenen Lösung wurden die zu untersuchenden Stoffe bei 20° im Überschuss zugefügt, und während 60 Minuten bei der Alkalinität pH = 10 gehalten.

Die Oxydation der reduzierten TR-Lösung wurde beurteilt durch die durch die zugesetzte Substanz wieder eintretende Blaufärbung.

Oxydation trat ein durch Zusatz von:

Chinon	unmittelbar
Chinhydron	»
m-Dinitrobenzol	nach 15 Minuten
m-Dinitrobenzoesäure	nach 1,5 Minuten.

Wie zu erwarten war, wurde auch durch Zusatz von Kaliumpersulfat eine unmittelbar eintretende Blaufärbung der red. TR-Lösung erhalten.

Keine Oxydationswirkung (Blaufärbung) trat ein nach Zusatz der folgenden Stoffe:

Pikrinsäure	2-Chlor-4-nitrophenol
1,2,6 Dinitrophenol	2,6 Dinitrotoluol
1,2,4 Dinitrophenol	2,4 Dichloranilin
2,4 Dinitroanilin	3,5 Dibrom-salicylsäure
2,4 Dinitrophenylhydrazin	5-Nitrosalicylsäureester

Mit Nitrobenzoesäure in alkalischer Lösung trat eine kräftige rote Färbung ein, über deren Ursache wir noch nichts näheres aussagen können.

Auffallend ist unter den bisher erhaltenen Ergebnissen die *Sonderstellung der beiden untersuchten m-Dinitro-Verbindungen*.

Im Anschluss an die Versuche mit der Leukoverbindung des Dichlorphenol-Indophenols wurden analoge Versuche mit *Methylen-weiss* angestellt. Auch diese Leukoverbindung wird durch Chinon und durch die m-Dinitro-Verbindungen oxydiert.

Die Endiol-Reaktion des Acetols

In unserer vorhergehenden Mitteilung¹ haben wir das Äthen-diol, das erste Glied der Reduktone, beschrieben. Im Anschluss daran wurde nun das Acetol ($\text{CH}_3\text{—CO—CH}_2\text{OH}$) in den Kreis der Untersuchung gezogen. Es war zu vermuten, dass es in alkalischer Lösung als Alkalisalz in die Endiol-Form übergeht.

Darstellung des Acetols aus Monobromaceton. Die Darstellung geschah im Wesentlichen nach der Vorschrift von NEF.²

6 g Monobromaceton wurden mit 4,7 g KAc in 10 ml Methanol 16 Stunden im geschlossenen Gefäss belassen, worauf das gebildete KBr abfiltriert wurde. Beim Destillieren des Filtrates unter vermindertem Druck ging das Acetolacetat bei 97°–100° über.

¹ EULER u. H. HASSELQUIST, *Dieses Arkiv*, 1, Nr. 24 (1949).

² NEF, *Lieb. Ann.* 335, 247 (1904).

2 ml Acetolacetat wurden in 4 ml Methanol gelöst und im Bombenrohr 5 Stunden bei 140° erhitzt, worauf die Reaktionslösung im Vacuum fraktioniert wurde, wobei das Acetol bei 79°-84° überging. (NEF gibt $K_{P18} = 54^\circ$ an.) Zur Kontrolle wurde mit Phenylhydrazin das Acetolosazon dargestellt und durch den Smp. identifiziert.

Titration des Acetols in alkalischer Lösung mit TR. 6,0 mg Acetol in 10 ml Wasser + 0,5 ml 2-n. NaOH verbrauchten 15,0 ml 0,1-n. TR. Demgemäss wurden 0,92 Mol. Endiol auf 1 Mol. Acetol gebildet.

11,3 mg Acetol in 10 ml Wasser + 1 ml 2-n. NaOH verbrauchten 28,0 ml 0,01 n. TR. Demgemäss entstanden 0,92 Mol. Endiol auf 1 Mol. Acetol.

Ein dritter Versuch lieferte das gleiche Ergebnis.

Dass nicht 1,0 Mol. Endiol auf 1 Mol. Acetol erhalten wurde kann darauf beruhen, dass es sehr schwer ist, das Acetol ganz wasserfrei darzustellen.

Die Endiol-Reaktionen des Adrenalins und des Nor-Adrenalins¹

Als Glied der aromatischen Klasse der Endiole wurde Adrenalin schon in unseren vorhergehenden Mitteilungen erwähnt. Ausser der Atomgruppierung des Brenzcatechins, welche im Adrenalin vorliegt, treten hier die Oxydationsformen des Adrenochroms und des Adrenochinons auf, welche in den oxydoreduktiven Vorgängen mehrerer tierischer Organe in Zusammenarbeit mit anderen Ergonen (Karotin, Vitamin A, Ascorbinsäure u. a.) eine wesentliche Rolle spielen.

Entsprechend unseren früheren Ergebnissen fanden wir bei neuen Versuchen in alkalischer Lösung für 1 Mol. Adrenalin einen Verbrauch von 0,1 Mol. TR.

Zum Vergleich werden neue Versuche mit Nor-Adrenalin angegeben. 4,2 mg Nor-Adrenalin-HCl-Salz in 20 ml Wasser gelöst wurden unter Stickstoff-Atmosphäre nach Zusatz von Kaliumacetat bis pH = 7 mit 0,01 n. TR-Lösung titriert. Kein Verbrauch von TR trat in neutraler Lösung ein. Nach Zusatz einiger Tropfen NaOH (etwa 0,1 ml 2-n. NaOH) bis zum Eintreten alkalischer Reaktion trat ein langsamer Verbrauch von TR ein. Es ergab sich, dass

1 Mol. Nor-Adrenalin 0,34 Mol. TR in alkalischer Lösung (0,01 n. NaOH) verbraucht.

Rückoxydation von Dehydroaskorbinsäure in alkalischer Lösung

Ebenfalls von biochemischen Gesichtspunkten aus wurde untersucht, in welchem Grad Ascorbinsäure, welche mit TR bis zum Farbumschlag oxydiert wurde, also Dehydroaskorbinsäure, durch Leuko-Dichlorphenol-Indophenol zurückreduziert werden kann.

15,4 mg Ascorbinsäure in 20 ml Wasser gelöst wurden mit TR bis zum Farbumschlag titriert, wobei 17,5 ml 0,01 n. TR verbraucht wurden. Die Lösung wurde mit N₂ durchströmt und wurde mit 1 ml 2-n. NaOH versetzt. Nach 30 Minuten wurde neutralisiert und mit TR titriert. Verbrauch 3,9 ml der 0,01 n. Lösung: Aus 1 Mol. Dehydroaskorbinsäure wurden 0,22 Mol. stabiles Endiol gebildet. Bei einem zweiten, mit 0,1 ml NaOH-Lösung angestellten Versuch entstanden 0,074 Mol. stabiles Endiol.

¹ Siehe hierzu U. S. v. EULER, Acta physiol. Scand. 11, 168 u. 12, 73 (1946). — Arch. int. Physiol. 35, 73 (1947). — Schweiz. med. Woch. 78, 777 (1948).

Isolierung von Produkten der alkalischen Spaltung von d-Xylose

1 g d-Xylose wurden in 45 ml Wasser gelöst und unter Stickstoffatmosphäre wurden 15 ml einer 2-n. NaOH-Lösung und 2,5 g Phenylhydrazinchlorhydrat zugesetzt und auf dem Wasserbad erwärmt. Bei 65° begann ein gelber Niederschlag auszufallen (bei der gleichen Temperatur beginnt in alkalischer Lösung der Verbrauch von TR bei der TR-Titration). Die Temperatur wurde 30 Minuten lang auf 65° gehalten; dann wurde abgekühlt und der Niederschlag abdekantiert. Der ölige Rückstand wurde mit Wasser gewaschen und mit etwas Methanol versetzt, wodurch das Öl in Lösung ging. Der feste Rückstand wurde dreimal aus 50 %iger Essigsäure umkrystallisiert, wodurch die reine Substanz mit dem Smp. 140°–141° in Form eines gelben, mikrokristallinen Pulvers ausfiel. Das so erhaltene Osazon erwies sich durch Bestimmung des Mischschmelzpunktes als Acetolosazon. Dieses Acetolosazon war früher erhalten worden aus Brenztraubensäurealdehyd, Milchsäurealdehyd und Glycerinaldehyd.¹

Bei der Spaltung der d-Xylose wird also unter den erwähnten Bedingungen eine Substanz mit 3 C-Atomen als Spaltprodukt erhalten.

Glucose-Gleichgewicht und Endiol-Bildung

Wir haben schon früher² auf die bemerkenswerten Versuche von LOBRY DE BRUYN³ und seiner MITARB. über die zwischen Glukose, Fruktose und Mannose unter dem Einfluss von Alkali entstehenden Gleichgewichte hingewiesen. Was die von LOBRY DE BRUYN erwähnte Bildung einer neuen Ketose (Glucose) betrifft, so kann man annehmen, dass es sich hierbei um die intermediäre Bildung eines Hexose-Reduktions handelt. Die präparative Darstellung eines solchen Reduktions, ev. eines Bis-Endiols, wird durch den Umstand erschwert, dass die von LOBRY DE BRUYN besprochene Umwandlung der Hexosen bereits unter Bedingungen eintritt, unter welchen sich eine Endiolgruppe noch nicht oder nur in sehr geringem Grad gebildet hat. Da dieser Punkt für die Aufklärung der Endiolbildung aus Zuckerarten von Bedeutung ist, haben wir vergleichend untersucht, wie die Änderung der optischen Drehung, welche mit dem Eintritt des Hexose-Gleichgewichtes erfolgt, mit dem Auftreten einer Endiol-Gruppe, also der Reaktion mit Tillmans Reagens (TR) parallel geht. Wir führen folgenden Versuch an:

10 g Glukose wurden in 100 ml Wasser gelöst und 24 Stunden zur Einstellung der Mutarotation stehen gelassen. Es wurden je 2 Proben von je 10 ml entnommen, von welchen eine mit 2 ml Wasser die andere mit 2 ml 2 N Natronlauge versetzt wurde. Beide standen in Stickstoffatmosphäre bei 20°.

Die Nullprobe hatte eine konstante Drehung von $\alpha = 4,000^\circ$ bzw. $(\alpha)_D = 55,8^\circ$ während 24 Stunden.

¹ NEUBERG und REWALD (Biochem. Z. 71, 146, 1914) erhielten Acetolosazon durch Umsetzung von Xylose in 10%igem Ammoniak mit Phenylhydrazin.

² EULER u. HASSELQUIST, KARRER-Festschrift, u. Exper. 5, 81 (1949).

³ LOBRY DE BRUYN u. Mitarb. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 16, 257 (1897).

Die alkalische Lösung ergab folgende Resultate:

Stunden	α	$[\alpha]_D$	TR ml 0,01 n.
0	4,000°	55,8°	0
2	2,785	38,8	0
4½	2,210	30,8	0
7	1,820	25,4	0
24	0,265	3,7	0,2

Nach 24 Stunden sind also nur 0,0024 mol stabiles Endiol gebildet worden, während die optische Drehung von 55,8° auf 3,7° abgenommen hat.

In einem zweiten Versuch wurde eine 1 n. Natronlauge unter den gleichen Bedingungen verwendet, wobei 0,003 Mol. stabiles Endiol gebildet wurden.

Stockholm, Universität, Institut für org.-chem. Forschung.

Tryckt den 4 augusti 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Antagonistische und aktivierende Wirkungen von Ribonukleinsäure, Streptomycin, Co- und Mg-Ionen bei Samenkeimung und Blutbildung

Von HANS VON EULER

I. Abschnitt

In vorhergehenden Mitteilungen wurde über den Einfluss von Streptomycin (STRM) und Streptidin (STRD) auf die Chlorophyllbildung in keimenden Gerstensen¹ und die fällende Wirkung² von STRM² und STRD³ auf Ribonukleate und Leberextrakte berichtet. Der dort zunächst beschriebene Effekt des STRM, nämlich die Hemmung der Chlorophyllbildung bei im Übrigen beibehaltener Entwicklung der keimenden Pflanzen wird hier eingehender verfolgt, in der Absicht, in die Biochemie der *genetisch definierten* Chlorophylldefekte Einblicke zu gewinnen.

Zu den chemischen Komponenten, welche an der Chlorophyllsynthese beteiligt sein müssen, gehört das Magnesium, welches bekanntlich an den Porphyrinkernen des Chlorophylls gebunden ist. Es fungiert ferner als Bestandteil lebenswichtiger Enzymsysteme; ausser seiner Teilnahme am Phosphatumsatz ist nach den Befunden von D. E. GREEN⁴ und von KUBOWITZ seine Zugehörigkeit zum Carboxylase-System zu erwähnen. Wir haben früher gezeigt⁵, dass in den Blättern einer chlorophylldefekten Gerstenmutante, *Albina 1*, der Mg-Gehalt etwa 30–40 % unter demjenigen der normalen Blätter liegt.

Auf die Anti-Chlorophyllwirkung des STRM haben wir durch Veränderung des Mg-Gehaltes der Keimungslösung bei Gerstensen keinen deutlichen Einfluss gefunden. Nur bei Samen von *Spinacia glabra* wurde in 4 von einander unabhängigen Versuchen insofern ein Effekt festgestellt, als bei Zusatz von 1,2 % MgCl₂ zu einer Keimungslösung von pH = 5,5 die Anti-Chlorophyllwirkung des STRM (weisse Blätter) erst bei einem höheren STRM-Zusatz eintrat als ohne Mg-Zugabe, was als eine gewisse Schutzwirkung des Mg-Salzes gedeutet werden kann. Ferner wird die von BRACCO und EULER⁶ beschriebene STRM-Hemmung des Ergrünens etiolierter Kohl-Blätter durch Zugabe von Mg-Salzen (1,5 % Mg) verzögert.

Entzug von Eisensalzen führt bekanntlich bei grünen Pflanzen zu Chlorose. Das Zusammenwirken von STRM-Zusatz und Eisen-Entzug zur Nährlösung wurde erst

¹ EULER, Kem. Arbeten Ny följd II Bd. 9. Mai 1947. — M. BRACCO u. EULER, ebenda Bd. 10. Oktober 1947. — Euler, Dieses Arkiv 25 A No 8 (1948).

² EULER u. HELLER, Dieses Arkiv 26 A No 14 (1938).

³ EULER u. HELLER, Dieses Arkiv 1 No 31 (1949).

⁴ D. E. GREEN u. SUBRAHMANYAN, J. biol. Chem. 138, 327 (1941).

⁵ EULER, D. BURSTRÖM, H. HELLSTRÖM u. B. v. KÖHLER, Z. physiol. Chem. 212 53 u. zw. 58 1932.

⁶ M. BRACCO u. EULER, Experientia, 4, 431 (1948).

in der letzten Zeit studiert, seitdem es gelungen ist, die STRM-Wirkung auch in späteren Stadien als bei der Keimung hervorzurufen. Wir sind in diesem Zusammenhang auf unsere früheren Versuche über den Einfluss von Kobaltsalzen zurückgekommen. In älteren Forschungsperioden hat man gelegentlich versucht, Fe durch Co zu ersetzen. Nach neueren Ergebnissen war im Gegenteil in Betracht zu ziehen, dass Kobaltsalze das Eisen aus seinen organischen Verbindungen zu verdrängen imstande sind.

Die Streptomycinwirkung kann nicht auf die Bindung des Eisens zurückgeführt werden; jedenfalls geben die Fällungsreaktionen, die man in vitro anstellen kann, keinen Anlass zu einer solchen Annahme.

Die bis jetzt angestellten Versuche an Gerstensamen¹ schienen zunächst eine Hemmung der Chlorophyllbildung zu veranlassen. In Analogie mit den mit STRM angestellten Versuchen wurden die mit Wasser gequollenen Samen in einer Lösung auf Filtrierpapier ausgebreitet, welche wechselnde Mengen Kobaltacetat oder Kobaltnitrat enthielten. Bei einer Co-Molarität von 0,001 wurden nach 6 Tagen die ersten Keimblätter zwar nicht weiss, wie bei STRM-Versuchen, aber deutlich bleicher als die unter den gleichen Umständen in Wasser gekeimten. Nach dieser Zeit traten aber die toxischen Wirkungen stark hervor und die Pflanzen starben ab. Es war nicht möglich die Konzentration der Kobaltsalze und die Versuchsbedingungen so zu wählen, dass bei ungestörter Entwicklung nur eine Chlorophyllhemmung eintrat.

Bei sehr kleinen Co-Konzentrationen der Lösungen, in welchen die Samen keimten, nämlich von 0,0001 bis 0,0005 mol. wurde eine *Beschleunigung der Keimung* und der darauf folgenden Entwicklung beobachtet.

Um diesen Effekt deutlicher hervortreten zu lassen wurden Samen in Lösungen gekeimt, welche gleichzeitig STRM und Co-Nitrat enthielten, und zwar in äquivalenten Mengen (0,005 mol.).

Eine Beeinflussung der Anti-Chlorophyllwirkung des STRM durch Kobaltacetat oder Kobaltnitrat konnte aber nicht festgestellt werden. Auch in vitro angestellte Versuche, bei welchen äquivalente Lösungen (0,001 mol.) dieser Stoffe bei pH 5,5 und pH 7 gemischt wurden, ergaben keine Fällungs- oder Bindungserscheinungen.

Im Anschluss an die in einer vorhergehenden Mitteilung beschriebenen Versuche mit STRM an chlorophylldefekten Mutanten, wurden Samen von *Albina-I*, welche ich der Samenzuchtanstalt SVALÖF verdanke, einerseits in Wasser, andererseits in 0,0005 mol. Kobaltnitratlösung gekeimt. Auch hier zeigte sich kein Einfluss, welcher für eine spezifische Fähigkeit des Kobalts, die Chlorophyllbildung zu fördern, sprechen würde.

Der Einfluss von Kobalt auf die Keimung von Samen ist weniger untersucht worden als der Einfluss von Mangan und Zink, welche nach G. Boy² schon in Konzentrationen von 0,1 % die Keimung verzögern.

Ein deutlicherer Einfluss des Kobalts auf die Chlorophyllbildung bzw. auf die Chlorophyll-Hemmung zeigte sich bei Keimungs-Versuchen an Roggen (*Secale cereale*) und an *Phleum pratense*.

¹ Diese Versuche wurden auch unter Zusätzen von Glucose oder Rohrzucker angestellt, wobei sich zeigte, dass der Anti-Chlorophyll-Effekt des STRM durch Rohrzucker-Konzentrationen von 5 % gehemmt wird. Es sind dann grössere STRM-Mengen erforderlich, um den gleichen Grad der Chlorophyll-Hemmung hervorzurufen.

² G. Boy, Bull. Soc. Chim. Biol. 27, 1414 (1935).

In 5 Parallelversuchen wurden je 100 Samen von Roggen bezw. von *Phleum pratense* in der früher beschriebenen Weise in 0,05 %iger Streptomycin-Lösung gekeimt.

Lösung A. Ohne weitere Zusätze.

» B. STRM + 0,1 % Kobaltnitrat

» C. STRM + 0,5 % Kobaltnitrat

» D. STRM + 0,5 % Kobaltnitrat + 1 % Ribonukleat

» E. STRM + 1 % Ribonukleat.

Die Keimungen verliefen in normaler Weise, auch die früher beschriebene Klauenbildung der Wurzeln trat in allen Lösungen (verhältnismässig schwach in Lösung E) ein.

Nach 9 Tagen waren in Versuch A von 92 gekeimten Roggensamen 58 annähernd frei von Chlorophyll bezw. Chloroplasten. In Serie B erwiesen sich von 89 gekeimten Samen 66 annähernd chlorophyllfrei (nur gefärbt durch ihren Gehalt an Anthocyanen).

In Serie C war die Zahl der annähernd chlorophyllfreien Pflanzen auf 70 gestiegen. Durch den Zusatz von Ribonukleat fiel der Anteil der chlorophyllarmen Pflanzen in Serie D auf 61.

Der Kontrollversuch E ergab von 94 gekeimten Samen 57 chlorophyllarme.

Wie diese Zahlen zeigen ist der Einfluss des Kobalts nicht gross aber immerhin unverkennbar. Die Versuchsserie an *Phleum pratense* wurde dadurch gestört, dass hier das Ribonukleat selbst einen noch nicht aufgeklärten Einfluss auf die STRM-Wirkung ausübt.

Diese Versuche werden in diesem Jahr in grösserem Maassstabe wiederholt.

Zur Aufklärung der obigen mit STRM und Ribonukleat und Kobaltnitrat angestellten Versuche und der Kobalt-Wirkung überhaupt wurden einige Versuche in vitro über die gegenseitige Beziehung von Kobaltsalzen und Ribonukleat angestellt.

1. Wie früher mit Calciumsalzen wurden nun mit Kobaltnitrat Fällungsversuche ausgeführt.

Lösungen: 0,2 %ige Ribonukleinsäurelösung, auf pH = 7 neutralisiert; 5,8 %ige (m/5 mol.) Kobaltnitratlösung $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ + 6 H_2O , auf pH = 7,2 neutralisiert.

Die folgende Tabelle zeigt die bei verschiedenen Verdünnungen der Kobaltnitratlösungen eintretende Fällung. Gemischt je 0,5 ml Co-Lös. und 0,5 ml Nukleatlös.

Nukleat	2,9 %	1,45 %	1,23 %	0,61 %	0,30 %	0,15 %
Kobaltnitrat	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,006	0,003
Fällung	+++	+++	++	+	—	—

Die Fällungsgrenze entspricht ungefähr derjenigen, welche bezg. Calciumchlorid von EULER, BRACCO und HELLER¹ festgestellt worden ist.

Für die Wirkungsweise der Kobaltsalze wurde dann noch eine katalytische Oxydationswirkung in Betracht gezogen. Zur Prüfung dieser Annahme wurden wechselnde Mengen von Kobaltnitrat zu Lösungen von Ascorbinsäure zugesetzt; Lösungen wurden mit solchen von reiner Ascorbinsäure gleicher Acidität und solchen verglichen, welche einen äquivalenten Cu-Gehalt hatten, welches nach unseren früheren Befunden ein starker Oxydationskatalysator ist. Der Zusatz von Kobaltnitrat erwies sich aber ohne Effekt.

¹ Kemiska Arbeten, Ny följd II, Bd. 10 (1948).

II. Abschnitt

Über den Einfluss von Ribonukleinsäure, Streptomycin und Kobaltsalzen auf die Zahl der Reticulozyten im Rattenblut

Während der Ausführung der im I. Abschnitt erwähnten Versuche, welche einen Einfluss des Kobalts auf die Chlorophyllbildung in keimenden Gerstensamen wahrscheinlich machen, hat eine hier im Gang befindliche Untersuchung über Wachstums- und Fertilitätswirkungen von Nahrungszusätzen, besonders von Leberpräparaten, Veranlassung gegeben, den Einfluss der in der Überschrift genannten Stoffe auf die Reticulozytenzahl des Rattenblutes zu studieren.

Kobalt-Avitaminosen sind in den letzten 10 Jahren wiederholt beschrieben worden, z. B. von DUNLOP und McCALLEN.¹ Hier sei nur auf die Zusammenfassungen von H. R. MARSTON² sowie von E. J. UNDERWOOD³ hingewiesen. Besonders in Süd- und West-Australien sind Co-Avitaminosen unter der Bezeichnung „Coast Disease“ unter Rindern und Schafen anscheinend häufig (und für diese Tiere spezifisch) aufgetreten und konnten durch ganz kleine Dosen von Co-Salzen geheilt werden. Es wurde bald bemerkt, dass Kobalt an der Blutbildung beteiligt ist und ORTEN und MITARB.⁴ sowie ELVEHJEM⁵ konstatierten die vermehrte Zahl von Erythrozyten bei Ratten, Meerschweinchen u. a. nach Injektion von grösseren Mengen von Co. Grosse Co-Eingaben hemmen die Hämoglobin-Bildung durch Fe.⁶ Über den Wirkungsmechanismus ist wenig bekannt geworden. Nach HELLERMAN u. MITARB.⁷ erhöht Co die Aktivität des Arginase-Systems.

Bei unseren Versuchen an Ratten lag es zunächst nahe, die Versuchstiere mit einer Co-freien Kost vorzubereiten. Die Schwierigkeiten, welche ELVEHJEM in dieser Hinsicht hatte, haben uns von derartigen Versuchen, eine synthetische Co-freie Kost zu bereiten abgehalten. Die Versuchstiere erhielten also die in diesem Institut übliche und oft beschriebene Grundkost SII + D teils mit den erforderlichen Vitamin-A-Zusätzen in Form von Carotin (3 γ per Tag) teils eine Vitamin-A-freie Kost bis zur Gewichtskonstanz und von da ab nur so viel Carotin, dass die Tiere bei dieser Gewichtskonstanz verblieben.

Die Jensensarkome tragenden Tiere erhielten gemischte Kost ad libitum.

Kobaltnitrat wurde den Ratten in Dosen von 5 γ per Tag (bzw. 15 γ jeden dritten Tag) intramuskular injiziert.

Die Zunahme des Körpergewichtes wurde verfolgt und mit der Gewichtszunahme der ohne Co gleichartig behandelten Ratten verglichen. Wir fanden die mittlere tägliche Gewichtszunahme:

A. für normale, 4-6 Wochen alte mit der Kost S II + D ernährte Ratten:

ohne Co-Injektion	0,75 g
mit 5 γ Co(NO ₃) ₂ per Tag	0,82 g

¹ G. DUNLOP u. W. J. McCALLEN, *Nature*, 147, 615 (1941).

² H. R. MARSTON, *Ann. Rev. of Biochem.* 8, 557 (1939).

³ E. J. UNDERWOOD, *Nutrition Abstracts*, 9, 520 (1940).

⁴ J. M. ORTEN u. Mitarb. *J. Biol. Chem.* 96, 11 (1932). —

⁵ F. J. STAKE u. C. A. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.* 99, 473 (1932).

⁶ ROBSCHT-ROBBINS und G. H. WHIPPLE, *J. exp. Med.* 75 481 (1942).

⁷ L. HELLERMAN u. M. E. PERKINS, *J. Biol. Chem.* 112, 175 (1936).

B. für Vitamin-A-arme Ratten (Vitamin-A-Entzug 21 Tage):

ohne Co-Injektion.....	0,04 g
mit 5 γ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ per Tag	0,03 g

C. für Sarkom-tragende Ratten (mittleres Körpergewicht 209 g, mittleres Sarkomgewicht 8 g):

ohne Co-Injektion.....	1,55 g
mit 5 γ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ per Tag	1,75 g

Die Dimensionen der Sarkome änderten sich in 12 Tagen (Mittel aus 8 Vers.).

ohne Co-Injektion	6,5 ccm–9,2 ccm
mit 5 γ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ per Tag	6,1 ccm–7,7 ccm

Eine 4. Versuchsreihe wurde ausgeführt im Anschluss an eine Wachstums- und Fertilitäts-Untersuchung bei verschiedenen Nahrungszusätzen, besonders bei Zusatz von Leberpräparaten. Die Ratten dieser Versuchsreihe erhielten zu der üblichen Grundkost *Folinsäure* und zwar ein synthetisches Pteroylglutaminat „Folvite“ (*L. casei* factor) der Firma LEDERLE, welches zuerst aus Ampullen intramuskular injiziert wurde.

Im Verlauf unserer Untersuchung über die Einwirkung von Kobaltsalzen auf die Chlorophyllbildung erhielt die Frage nach der biologischen Rolle des Kobalts im Tierorganismus und besonders bei der Blutbildung ein besonders aktuelles Interesse durch die Ergebnisse über das „Vitamin B₁₂“.

Durch die gleichzeitigen Forschungen der Forschungslaboratorien MERCK u. Co., RAHWAY¹, und der GLAXO-Laboratorien, GREENFORD (E. LESTER SMITH)² hat sich ergeben, dass das Vitamin B₁₂ Co enthält. Die Prüfung an *L. lactis* zeigte für ein Präparat des Merck'schen Arbeitskreises eine ausserordentlich hohe Aktivität im Vergleich zu reinem Co, das sich in Versuchen von R. WEST als unwirksam gegen perniziöse Anämie erwiesen hatte. Nach den Ergebnissen der beiden Forschungsstätten bildet Vitamin B₁₂ rote Krystalle, die (in vacuo bei 56° getrocknet) 4,0 % Co enthalten. Das Molekulargewicht scheint angenähert dem Wert 1600 zu entsprechen. Vitamin B₁₂ enthält Phosphor und Stickstoff. Auffallend ist die Angabe, dass die Autoklavierung einer Lösung bei 121° während 15 Min. die Aktivität nicht ändert. In alkalischer Lösung wird das Vitamin unter Hydrolyse inaktiviert. Das neuerdings auch in *Streptomyces griseus* nachgewiesene³ hochaktive Vitamin stimmt in seinen Eigenschaften mit dem aus Leber gewonnenen überein.

Das kürzlich von E. R. NORRIS u. J. J. MAJNARICH⁴ beschriebene Pteroyl-Derivat „Vitamin B₁₄“ wird als Co-frei angegeben (4 % P und 19,6 % N).

Zahl der vitalfärbbaren roten Blutzellen im Rattenblut nach Injektion von Kobaltacetat und Pteroylglutaminat

Die Versuchsmethodik war die gleiche wie bei früheren Untersuchungen aus diesem Institut.⁵ Zur Zählung der Erythrozyten wurden nach Coupierung des

¹ E. L. RICKES et al., Science, 108, 134 (1948).

² E. LESTER SMITH, Nature 161, 638 (1948). — 162, 144 (1948).

³ E. L. RICKES et al., Science, 108 634 (1948).

⁴ E. R. NORRIS u. J. J. MAJNARICH, Science, 109, 32 (1949).

⁵ EULER u. M. MALMBERG, Z. physiol. Chem. 249, 85 (1937). — 252, 24 (1938). — 256, 243 (1938). — N. BARGONI, Dieses Arkiv 1, Nr 11 (1949).

Schwanzes der Vene Blut entnommen, das in einem Burker'schen Hämatometer untersucht wurde (N. BARGONI).

Die Färbung und Rechnung der Reticulozyten geschah nach der von HEILMEYER modifizierten Methode von HOLBOLL: Je 0,1 ml Blut der Schwanzvene wird in einer paraffinierten Cuvette mit 0,025 ml einer 1 %igen Lösung von Brilliantkresolblau in physiologischer Kochsalzlösung gemischt und nach 30 Minuten auf einem Objektträger ausgebreitet. Nach Fixierung mit Methylalkohol färbt man nach GIEMSA.

Die 4 Parallelversuche zu den nachfolgenden Serien ergaben die folgenden Mittelwerte für 150–175 g schwere normale Ratten:

Erythrozyten.....	6,3 10^6 /ml	Reticulozyten.....	2,4 %
-------------------	----------------	--------------------	-------

Nach Injektion von 45 γ Kobaltnitrat und einer Inkubationszeit von 2 Tagen hatte sich am Blutbild wenig geändert:

Erythrozyten.....	6,55 10^6 /ml	Reticulozyten.....	2,9 %
-------------------	-----------------	--------------------	-------

Nach Injektion von 500 γ Kobaltnitrat und einer Inkubationszeit von 38 Stunden wurde gefunden:

Erythrozyten.....	6,05 10^6 /ml	Reticulozyten.....	1,8 %
-------------------	-----------------	--------------------	-------

Jensen-Sarkom tragende Ratten. Mittleres Gewicht 175–200 g. Mittlere Sarkomdimensionen: 0,5 $\times$ 1,6 $\times$ 0,7 cm, also im Mittel 0,5 cm:

Erythrozyten.....	6,15 10^6 /ml	Reticulozyten.....	1,4 %
-------------------	-----------------	--------------------	-------

Nach Injektion von 45 γ Kobaltnitrat; Inkubationszeit 2 Tage:

Erythrozyten.....	6,2 10^6 /ml	Reticulozyten.....	1,65 %
-------------------	----------------	--------------------	--------

Nach Injektion von 45 γ Kobaltnitrat + 1 mg RNS.-Inkub. 2 Tage:

Erythrozyten	6,0 10^6 /ml	Reticulozyten.....	2,5 %
--------------------	----------------	--------------------	-------

Die Änderung der Mittelwerte der prozentischen Reticulozytenzahl liegt innerhalb der Variationsgrenzen und kann also noch keineswegs als signifikativ angesehen werden. Wie schon früher mehrmals betont wurde, bedeutet die Erhöhung der Reticulozytenzahl übrigens nicht eine gesteigerte Synthese dieser Blutzellen, sondern eine gesteigerte Ausschüttung.

Unsere mit Kobaltsalzen gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Erhöhung der Co-Konzentration durch Injektion mässiger Mengen Co an sich weder die Blutbildung fördert noch die Reticulozytenzahl steigert, sofern nicht der zugehörige hämopoietische Faktor im Überschuss vorhanden ist oder gleichzeitig mit dem Kobaltsalz eingegeben wird. Von diesem Gesichtspunkt aus wurde in 4 weiteren Versuchen gleichzeitig mit dem Kobaltsalz (45 γ) die 10-fache Menge Pteroylglutaminat (450 γ) injiziert; indessen konnte auch in diesen Versuchen weder eine vermehrte Blutbildung noch eine Erhöhung der Reticulozytenzahl nachgewiesen werden. Man kann nach den S. 267 erwähnten neueren Ergebnissen annehmen, dass das Pteroylglutaminat erst enzymatisch umgewandelt werden muss, ehe es mit Kobalt aktive Komplexe bilden kann.

Stockholm, Universität, Vitamininstitut und Institut für org.-chem. Forschung.

Tryckt den 4 augusti 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Crystal structure studies on tetragonal sodium tungsten bronze

By ARNE MAGNÉLI

In a paper on the cubic sodium tungsten bronze (1) HÄGG presented a few observations concerning the blue tetragonal sodium tungsten bronze. This compound was prepared by electrolytic reduction of fused acid sodium tungstate of the composition $\text{Na}_2\text{WO}_4 + 2\text{WO}_3$ at 800°C between platinum electrodes. The product was purified by repeated alternate boilings with concentrated sodium carbonate solution and concentrated hydrochloric acid and finally with a mixture of fuming nitric acid and a small amount of hydrofluoric acid. After this treatment the bronze remained in the form of rather long blue needles. Preliminary analyses indicated the composition to be $\text{Na}_{0.2-0.3}\text{WO}_3$. The Laue symmetry was $D_{4h} - 4/mmm$ and the dimensions of the unit cell as obtained from rotation photographs $a = 12.13\text{ \AA}$ and $c = 3.77\text{ \AA}$. The density was found to be 7.18, corresponding approximately to a cell content of 10 formula units $\text{Na}_{0.2-0.3}\text{WO}_3$.

Later the investigation was continued at this Institute by HÄGG in collaboration with LINDQVIST (2). They found from very amply exposed rotation photographs, taken with Cu-K radiation, that the bronze possesses a superstructure giving rise to very faint intermediary layer lines in the photographs with rotation around the needle axis $[001]$. The length of the tetragonal axis of the unit cell was thus twice the figure previously reported. The superstructure reflections could not be positively identified in the powder photographs. The missing spectra of the sublattice were those characteristic of the space-groups $D_4^2 - P42_1$ and $D_{2d}^3 - P42_1m$. The dimensions of this cell as calculated from Cr-K powder photographs are given in Table I.

HÄGG and LINDQVIST have kindly permitted the use of all of their preparations and experimental data concerning the tetragonal sodium tungsten bronze. The complete determination of the structure of this compound has turned out to be a rather difficult task and has not as yet been accomplished. However, the results obtained at present may be of some interest as they demonstrate the relation of this structure to that of the tetragonal potassium tungsten bronze (3).

The composition of the bronze

The sample of bronze made by HÄGG was analysed in a manner described elsewhere (4). The formula arrived at, $\text{Na}_{0.23}\text{WO}_3$, confirms HÄGG's opinion

concerning the composition of this substance. A few supplementary attempts have been carried out to synthesize preparations of tetragonal bronze containing various amounts of sodium. It was not possible to obtain pure specimens by reducing acid sodium tungstates with hydrogen (cf. the preparation of tetragonal potassium tungsten bronze (3)). By varying the composition by the electrolytic reduction of acid tungstates, samples of different compositions were obtained, showing unit cell dimensions which deviate slightly from those mentioned above.¹ Data on one of these products are given in Table I. However, no systematic attempts have been made to establish the extension of the homogeneity range of the bronze.

Table I.

Synthesis and Unit Cell Dimensions of Preparations of
Tetragonal Sodium Tungsten Bronze obtained by Electrolysis.²

Composition of the electrolysed mixture	Current density at the cathode	Composition of the bronze	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>V</i>
$\text{Na}_2\text{WO}_4 + 2\text{WO}_3$	No data available	$\text{Na}_{0.28}\text{WO}_3$	12.094 Å	3.748 Å	548.2 Å ³
$\text{Na}_2\text{WO}_4 + 1.5\text{WO}_3$	0.3 A/cm ²	$\text{Na}_{0.38}\text{WO}_3$	12.102 Å	3.752 Å	549.5 Å ³

The sublattice

The study of the sublattice has been based on Weissenberg photographs taken around [001] with Mo-*K* radiation and using a minute crystal (from the preparation made by HÄGG) in order to diminish the influence of absorption. Relative values of the structure amplitudes were obtained in the way described in (3). There is an almost complete analogy between the F_{hk0}^2 values of the sodium and potassium bronzes, indicating a far-reaching similarity in the arrangement of the W atoms of the two substances. The projection of the *g* function of the sodium bronze could thus be computed, using the signs of the various structure factors derived for the potassium compound. In this way the following W positions were arrived at, giving fair agreement between observed and calculated F_{hk0} values³:

¹ By electrolytic reduction of mixtures richer in WO_3 than those listed in Table I dark blue crystals were obtained, which possibly consist of a hitherto unknown sodium tungsten bronze. This substance will be investigated in the near future. It is noteworthy that the current density also seems to have influence on the composition of the products (cf. KAHLENBERG and KAHLENBERG (5)).

² The first line gives the data for the preparation made by HÄGG. — The unit cell dimensions refer to the wave lengths of Cr- $K\alpha_1$ and Cr- $K\alpha_2$ radiation equal to 2.28962 Å and 2.29352 Å respectively.

³ The origin of the unit mesh is chosen to bring about conformity with the space-group $P4/mbm$ (the symmetry of tetragonal potassium tungsten bronze) as described in «International Tables for the Determination of Crystal Structures» (Berlin 1935). This agrees with the position of the origin in $P4_2/m$ but not in $P4_2$. — The Fourier summation was carried out by means of the HÄGG-LAURENT machine (6).

2 W₁ in a twofold point position: $0\frac{1}{2}; \frac{1}{2}0$.

8 W₂ in an eightfold point position: $xy; \frac{1}{2} - x, \frac{1}{2} + y;$

$$\bar{x}\bar{y}; \frac{1}{2} + x, \frac{1}{2} - y;$$

$$\bar{y}x; \frac{1}{2} + y, \frac{1}{2} + x;$$

$$y\bar{x}; \frac{1}{2} - y, \frac{1}{2} - x.$$

$$x = 0.077 \quad y = 0.207.$$

These W₂ coordinates are in close accordance with those derived for the potassium bronze, viz. $x = 0.078$ and $y = 0.209$.

In the unit cell of the potassium bronze all the W atoms are situated in one plane normal to [001]. Some of the reflections $0kl$ with k odd, appearing in the photographs of the sodium compound but absent in the potassium bronze diagrams, are rather strong and must be due to the W atom sheet being puckered. A relatively slight displacement in the c direction of certain W atoms from their positions in the potassium compound may account for the presence of these reflections. However, as reflections have only been observed with a maximum value of $l = 4$, exact z coordinates could not be easily calculated.

The W arrangements of the tetragonal sodium and potassium tungsten bronzes are thus essentially the same, the W lattice of the former compound being slightly modified towards a lower symmetry. As the cell dimensions are also nearly the same, the W-W distances of the two substances cannot be very different. This makes an analogous arrangement of the O atoms of both compounds seem very probable. For the potassium bronze a distribution scheme of the thirty O atoms of the unit cell was derived from considerations of space. This led to a sixfold coordination of O atoms around the W atoms, and WO₆ octahedra joined by corners. Thus the O atoms of the sodium bronze are likely to be arranged in a similar way.

The Na atoms may partly occupy the corresponding interstices of the lattice as are the sites of the K atoms of the potassium compound.

The superstructure

The reflections of the superstructure could not be observed in the Mo-K diagrams and had to be studied in photographs taken with Cu-K radiation. The layer lines with $l = 1$ and 3 were registered in Weissenberg photographs with rotation around [001]. In spite of very ample exposure the reflections were very weak. They all correspond to the a axis of the unit cell being $\sqrt{2}$ times that of the sublattice cell. This a axis of about 17.1 Å is in approximate agreement with a value reported by DE JONG and STEK (7). The volume of the unit cell is thus 4 times that of the sublattice cell.

The very low intensity of the reflections might possibly indicate that the superstructure is due to the arrangement of the Na atoms. However, no attempt has as yet been made to unravel this problem.

SUMMARY

The tetragonal sodium tungsten bronze with a variable composition Na_xWO_3 (x values from 0.28 to 0.38 being observed) has been investigated by means of X-rays. The structure is very closely related to that of the tetragonal potassium tungsten bronze previously determined by the author but modified towards a lower symmetry. The lattice is composed of WO_6 octahedra joined by sharing corners, the Na atoms being inserted in interstices in this structure. The existence of a superstructure has been established.

The author wishes to thank Professor G. HÄGG and Dr. I. LINDQVIST for allowing him to continue their investigation on this subject. Thanks are extended to Mr. ERIK VON SYDOW for his valuable assistance with the synthetic work. This investigation forms part of a research program financially supported by the Swedish Natural Science Research Council.

Institute of Chemistry, University of Uppsala, May 1949.

REFERENCES. (1) G. Hägg, *Z. phys. Chem. (B)* 29, 192. 1935. — (2) G. Hägg and I. Lindqvist, Unpublished. — (3) A. Magnéli, *Arkiv för Kemi* 1, N:o 22. 1949. — (4) —, *Arkiv för Kemi* 1, N:o 40. 1949. — (5) L. Kahlenberg and H. H. Kahlenberg, *Trans. Am. Electrochem. Soc.* 46, 181. 1924. — (6) G. Hägg and T. Laurent, *J. Sci. Instr.* 23, 155. 1946. — (7) W. F. de Jong and H. J. Stek, *Z. Krist.* 83, 496. 1932.

Tryckt den 6 augusti 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Notes on the analysis of tungsten bronzes

By ARNE MAGNÉLI

In connection with crystal structure studies on certain alkali tungsten bronzes (1, 2) accurate knowledge of the compositions of the investigated compounds was needed. As such analyses are rather troublesome due to the difficulty of bringing the bronzes in soluble form, it was felt that a few observations made during this work were worth mentioning.

The analytical methods were tested using tetragonal potassium tungsten bronze, cubic and tetragonal sodium tungsten bronzes. The samples of cubic sodium bronze had been synthesized by HÄGG (3). The potassium compound was prepared by reducing acid potassium tungstate in a slow stream of hydrogen at about 600° C (1) whilst the tetragonal sodium bronze was obtained by cathodic reduction of fused acid sodium tungstate (3, 2). All the preparations were carefully purified by treatment with strongly alkaline, acid, and oxidizing reagents.

The various bronzes were analysed for alkali and tungsten content, and those relatively rich in alkali furthermore for the oxygen deficit in relation to the completely oxidized products corresponding to all the tungsten in the sexavalent state.

Determination of the alkali content

The alkali content of the bronzes was determined according to two different methods.

I. SPITZIN and KASCHTANOFF (4) have studied the behaviour of various tungsten compounds when heated in a stream of hydrogen chloride gas. They found that sodium tungstate when treated in this way is converted into volatile tungsten oxychloride and sodium chloride. The same products are obtained when sodium tungsten bronze is heated in hydrogen chloride gas contaminated with oxygen. If, however, the gas is perfectly pure, the bronze decomposes into volatile tungsten oxychloride and a nonvolatile residue of sodium chloride and metallic tungsten. SPITZIN and KASCHTANOFF utilized these observations for the analysis of sodium tungsten bronzes (5). They oxidized the compounds in an oxygen stream at 500° C and decomposed the tungstates formed in this way at 500–550° C with hydrogen chloride gas. The oxygen deficit was given by the increase in weight after the oxidation¹, and the alkali content could be determined from the weight of the sodium chloride residue.

¹ According to HÄGG (3) the oxidation is not quantitative.

In this investigation the method was only used for the determination of alkali. A silica boat containing a sample of about 0.4 g of the finely powdered tungsten bronze was placed in a silica tube and a slow stream of hydrogen chloride gas and oxygen was introduced. The sample was heated to about 500° C by means of an electric furnace. In this way tungsten bronzes rich in alkali were decomposed in two or three hours, while the tetragonal sodium compound had to be heated for longer periods. A complete volatilization of the tungsten was not always accomplished as the residue in the boat was sometimes not completely soluble in water. The insoluble matter, never exceeding 2 p. cent by weight of the residue, evidently consisted of acid alkali tungstate as it was easily soluble in ammonia. The alkali content of these compounds, being very low, was neglected. The water soluble part of the non-volatile residue could thus be titrated according to MOHR for the amount of chlorine equivalent to the alkali content of the bronze. This method turned out to be convenient for the analysis of bronzes rich in alkali but a little slow for investigating the tetragonal sodium compound.

A somewhat similar but rather rapid procedure has been practiced by VAN DUYN (6) who oxidized sodium tungsten bronzes with a paste of mercuric oxide and weighed the non-volatile residue consisting of sodium chloride after the oxidation products had been decomposed by heating in a stream of chlorine and sulfur chloride. However, this method was thought to be a little more laborious than the one described below.

II. According to BRUNNER (7) tungsten bronzes are rapidly decomposed when heated with ammonium peroxydisulfate. This was found to be a convenient method for bringing all the bronzes in soluble form for the determination of the alkali content.

About 0.3 g of finely powdered tungsten bronze was carefully heated in a platinum crucible with 3 g of ammonium peroxydisulfate. When the bronze was entirely decomposed, the melted material was dissolved in water and some ammonia. The ammonium salts were removed by heating with aqua regia on a steam bath and the sulfuric acid expelled by evaporating to dryness. The residue was dissolved in a slight excess of ammonia and diluted with water. In order to isolate the alkali ions the solution was percolated through an ion exchanger (Amberlite IR 100) saturated with ammonium ions (cf. RYNEBERG and SAMUELSON (8)).¹ The alkali ions were then eluted by means of hydrochloric acid. The eluate was evaporated to dryness, the ammonium chloride removed by heating, and the amount of alkali determined by titrating the residue for the equivalent amount of chlorine according to MOHR. The value found in this way had to be corrected for the blank obtained by treating ammonium peroxydisulfate in the same manner. This correction was very small for the Kahlbaum preparation used.

¹ It was not easily possible to determine the tungsten content in the filtrate which was contaminated to some extent as the ion exchanger was not completely resistant to the alkaline solution.

Determination of the tungsten content

The determination of the tungsten content of the bronzes was based on the method of BERZELIUS, i. e. the tungsten was precipitated as mercurous tungstate, which was decomposed by heating, after which the remaining tungsten trioxide was weighed.

About 0.3 g of finely powdered bronze was decomposed by heating with sodium carbonate and sodium nitrate in a platinum crucible. The water solution of the melted material was neutralised with nitric acid using methyl orange as an indicator. After the solution had been heated to boiling the tungsten was precipitated by adding a solution of mercurous nitrate in excess. This reagent had been prepared according to SPITZIN (9) without the addition of acid. The mercurous tungstate was filtered off, dried and decomposed by moderate heating. The tungsten trioxide formed was ignited to constant weight in an electric furnace at 850° C.

Determination of the oxygen deficit

It has been pointed out by PHILIPP and SCHWEBEL (10) that sodium tungsten bronzes are decomposed by the action of an alkaline solution of potassium hexacyanoferrate(III). This fact has been utilized for the analysis of sodium bronzes by VAN DUYN (6), who dissolved the finely powdered bronze by means of a known amount of hexacyanoferrate(III) and determined the excess of the oxidizing agent by iodometric titration. It was found that this method gave satisfactory results in analyses for the oxygen deficit of potassium bronzes and cubic sodium bronzes rich in alkali. However, the method does not seem to be applicable for the analysis of tetragonal sodium tungsten bronzes, a sample of which could not be decomposed even by very intense treatment with an alkaline solution of hexacyanoferrate(III).

Table I.

Compositions of a number of alkali tungsten bronzes, Me_xWO_3 .

	Value of x derived from the determination of			
	the alkali content according to method no. I	the alkali content according to method no. II	the tungsten content	the oxygen deficit
Tetragonal sodium tungsten bronze.	0.285	0.279	0.283	—
Tetragonal potassium tung- sten bronze no. I.	0.475	0.474	—	—
Tetragonal potassium tung- sten bronze no. II.	0.494	—	0.491	0.488

Results of the analyses

According to a generally accepted idea the alkali tungsten bronzes may be represented by a formula Me_xWO_3 , x being a number less than unity. The present analytical investigation has given results in accordance with this view, which is also confirmed by determinations of the crystal structures of the studied bronzes (1, 2). Table I gives the x values of the general formula derived from the results of the various analytical methods given above for a number of preparations of bronzes.

SUMMARY

Preparations of tetragonal sodium and potassium tungsten bronzes have been analysed for contents of alkali and tungsten, the bronzes richer in alkali moreover for the amount of oxygen necessary to oxidize all the tungsten to the sexavalent state. The analytical methods used are described. The results show the investigated compounds to correspond to the general formula Me_xWO_3 , as has been confirmed by crystal structure studies (1, 2) as well.

The author wishes to thank Professor G. HÄGG for his encouraging interest in this investigation. He is also indebted to Dr. F. NYDAHL for many valuable discussions. Thanks are extended to Miss BIRGITTA BLOMBERG, Mr SIGURD KÖHLER and Mr ROBERT NILSSON for valuable assistance with the analyses. This investigation has been supported by a grant from the Swedish Natural Science Research Council, which is gratefully acknowledged.

Institute of Chemistry, University of Uppsala, May 1949.

REFERENCES. (1) A. Magnéli, *Arkiv för Kemi* 1, N:o 22. 1949. — (2) —, *Arkiv för Kemi* 1, N:o 39. 1949. — (3) G. Hägg, *Z. phys. Chem. (B)* 29, 192. 1935. — (4) V. Spitzin and L. Kaschtanoff, *Z. anorg. Chem.* 157, 141. 1926. — (5) —, *Z. anal. Chem.* 75, 440. 1928. — (6) D. van Duyn, *Rec. Trav. Chim.* 61, 669. 1942. — (7) O. Brunner, *Dissert.* Zürich 1903. — (8) G. Runeberg and O. Samuelson, *Sv. Kem. Tidskr.* 57, 250. 1945. — (9) V. Spitzin, *Z. anal. Chem.* 75, 433. 1928. — (10) J. Philipp and P. Schwebel, *Ber.* 12, 2234. 1879.

Tryckt den 6 augusti 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

The crystal structure of $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$

By GEORG LUNDGREN and LARS GUNNAR SILLÉN

With 8 figures in the text

General remarks on hydrolysis

It is well known that the solutions of a number of salts with metal cations have an acid reaction. To account for this fact it was once believed that the hydroxides are formed immediately in the solution; formulae like $\text{AlCl}_3 + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Al}(\text{OH})_3 + 3 \text{HCl}$ or $\text{Al}^{3+} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Al}(\text{OH})_3 + 3 \text{H}^+$ can still be seen in certain text-books.

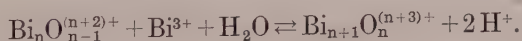
The work of BRÖNSTED and VOLQVARTZ (1928) on the hydrolysis of Al^{3+} and Fe^{3+} showed that the process in these cases could be explained as a splitting off of one proton (to begin with) from the acid aquo-ions $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+} (\rightleftharpoons \text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}^{2+} + \text{H}^+)$ and $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+} (\rightleftharpoons \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}^{2+} + \text{H}^+)$. After this paper there was a tendency to assume that at higher pH the process would go further with the formation of new mononuclear complexes: $\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$, $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3$, $\text{Al}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2^-$ etc., and that similar processes would occur with most other ions.

In later years, however, evidence has been accumulating that *polynuclear* complexes are very often formed. This seems to be the case with Al^{3+} too (C. BROSSET, private communication). It has often been tried with varying success to ascribe to these complexes one or a few definite formulae, such as $\text{Bi}_2(\text{OH})_4^{2+}$, $\text{Bi}_2(\text{OH})_5^+$ (HOLM-QVIST 1936) or $\text{Pb}_2(\text{OH})_3^{3+}$, $\text{Pb}_4(\text{OH})_4^{4+}$ (PEDERSEN 1945). However, if there is a process that can unite a certain number of metal ions into a polynuclear complex, it seems reasonable that the same process will in general be able to form complexes with any number of metal ions.

The first to apply this argument to quantitative studies of hydrolysis seem to have been GRANÉR and SILLÉN (1947), who found that their measurements of (Bi^{3+}) and (H^+) in series of Bi^{III} solutions of varying composition could be surprisingly well explained by assuming the general mechanism to be:



generally,



(It is very possible that other similar complexes such as $\text{Bi}_n\text{O}_n^{n+}$ also occur.) By measurements of equilibria in aqueous solutions it is impossible in principle to decide how many molecules of the solvent take part in the reaction; whether, for example, the binuclear complex is Bi_2O^{4+} with an oxygen bridge or $\text{Bi}_2(\text{OH})_2^{4+}$ with a double hydroxyl bridge. However, the choice is aided in favour of oxygen

bridges by considering the known crystal structures of a large number of "basic" bismuth compounds, which have proved to contain sheets of composition $\text{Bi}_n\text{O}_n^{n+}$ (BANNISTER and HEY 1935; SILLÉN 1940, 1942; LAGERCRANTZ and SILLÉN 1948) with oxygen bridges; in no case have hydroxyl bridges hitherto been proved to exist between Bi^{3+} ions.

Hydrolysis of Th^{4+}

The behaviour of the ion Th^{4+} is of a certain general interest since many other large quadrivalent ions can be expected to behave similarly: Hf^{4+} , Ce^{4+} , Zr^{4+} , (perhaps to some degree Ti^{4+}), U^{4+} , Np^{4+} , Pu^{4+} and Am^{4+} .

Dr JOHN KASPER's measurements (in 1941, private communication by Professor K. A. KRAUS) were explained by assuming a mononuclear reaction $\text{Th}^{4+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ThOH}^{3+} + \text{H}^+$ with $\text{p}K \approx 3.5$. However, FAUCHERRE and SCHAAL's (1947) measurements, and especially those of S. HIETANEN (not yet published) over a range of pH and total Th concentrations, indicate that in this case, too, polynuclear complexes are formed.

In order to get some idea of the mechanism of the hydrolysis of Th^{4+} —e.g. whether oxygen or hydroxyl bridges are formed—we decided to try to find the crystal structure of a suitable "basic" thorium salt. A survey of the literature showed that, unfortunately, most thorium hydroxy (or oxy) salts contain so much water of crystallisation that the deduction of the positions of the light atoms could be foreseen to be a difficult and rather uncertain task.

However, the thorium chromates seemed quite promising from our point of view, since they contain comparatively little water. Moreover, the chromium atoms are so heavy that even in the presence of Th it should be possible to determine their positions with a certain degree of accuracy from their contribution to the amplitudes of the X-ray reflections.

Thorium chromates

In GMELIN-KRAUT's Handbuch (1928) thorium chromates with formulae $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4$, $\text{Th}(\text{CrO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_{0, 1, 3 \text{ or } 8}$ and $\text{Th}(\text{CrO}_4)_2\text{CrO}_3(\text{H}_2\text{O})_3$ are described; since then no work on thorium chromates seems to have been published. Of these, we decided first to investigate $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4$.

PALMER (1895) obtained a yellow precipitate on mixing solutions of thorium nitrate and potassium chromate. After drying in an oven at 100°C , the product was analysed for Th and Cr, and the composition was concluded to be $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4$. The existence of this compound was doubted by BRITTON (1923, 1926) who studied the system $\text{ThO}_2\text{—CrO}_3\text{—H}_2\text{O}$ at 25°C and made a pH titration of ThCl_4 aq with K_2CrO_4 aq at 18°C , and concluded that PALMER's compound was only a mixture of $\text{Th}(\text{OH})_4$ and $\text{Th}(\text{CrO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_x$.

Nevertheless, we were able to produce a crystalline thorium hydroxide chromate by a procedure somewhat similar to PALMER's. The formula, however, was found to be $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$ rather than $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4$.

Later on, one of us intends to publish a more detailed description of the conditions for preparing various thorium chromates and, if possible, the crystal structure of one or two of them.

Preparation of the crystals

A solution of 1 g $K_2Cr_2O_7$ in 1 000 ml of water was heated to boiling, and a solution of 1 g $Th(NO_3)_4(H_2O)_4$ in about 10 ml of water slowly added; the temperature was never allowed to sink below $90^\circ C$. A flocculent precipitate appeared, which after a few hours' boiling became visibly crystalline. This latter process was accelerated, if a few ml of conc. HNO_3 were added. If the solution contained much less than 1 g of $K_2Cr_2O_7$, the precipitate did not crystallize within a reasonable time; if it contained much more, only very small crystals were obtained, and the precipitate was sometimes contaminated with $Th(CrO_4)_2(H_2O)_x$.

The crystals were filtered off from the hot solution, washed with water, and dried in air. On keeping in a desiccator over conc. H_2SO_4 they did not lose weight, but if we heated them to $100^\circ C$ in an oven, (as PALMER did before analyzing his product) the crystals lost water and formed a new phase, as was shown by the powder photographs. — This is obviously the reason why PALMER found less water in his product than we did in ours.

Analysis

The formula for the air-dried substance was found to be $Th(OH)_2CrO_4H_2O$ or perhaps $ThOCrO_4(H_2O)_2$.

The sample was dissolved in 2 C HNO_3 , and the amount of *chromate* determined by iodometric titration. Thorium and chromium(III)hydroxides were then precipitated with ammonia, filtered off, washed with water, ignited, and weighed as $ThO_2 + Cr_2O_3$. From the known amount of Cr_2O_3 , the amount of *thorium* was calculated.

The *water* was determined by BRUSH (1868) and PENFIELD'S (1894) method, as given in KOLTHOFF and SANDELL (1936).

The *density* of the crystals was determined from the loss of weight in benzene.

	Found		Calculated for $Th(OH)_2CrO_4H_2O$
% CrO_3	25.6	25.5	24.99
% ThO_2	67.7	67.1	66.01
% H_2O	8.8	9.4	9.00
density	4.32	4.37	4.46 (see below)

The values for ThO_2 are seen to be high, which may be caused by the Cr in the " ThO_2, Cr_2O_3 " mixture partly having a valency higher than 3.

Unit cell and space group

Under the microscope $Th(OH)_2CrO_4H_2O$ proved to consist of transparent, yellow, rod-like crystals of about 0.1 mm in length.

A crystal was set with the needle axis as rotation axis, and rotation and WEISSENBERG photographs (zero, first, and second layer) were taken using Cu $K\alpha$ -radiation. From these we concluded that the LAUE symmetry is the monoclinic $C_{2h}-2/m$ and that the b axis coincides with the needle axis. The dimensions of the unit cell were determined more accurately from powder photographs with Cr $K\alpha$ -radiation and focussing cameras of the PHRAGMÉN-WESTGREN-type (Table 1).

$$a = (7.66_2 \pm .01) \text{ kX} = (7.67_7 \pm .01) \text{ \AA}$$

$$b = (6.10_1 \pm .01) \text{ kX} = (6.11_3 \pm .01) \text{ \AA}$$

$$c = (6.92_6 \pm .01) \text{ kX} = (6.94_0 \pm .01) \text{ \AA}$$

$$\beta = 113.87 \pm .10^\circ$$

$$V = 296.0_7 \text{ kX}^3 = 297.8_3 \text{ \AA}^3$$

For the determination of the lattice parameters only reflections with $\sin^2 \theta < 0.7$ were used, since for higher $\sin^2 \theta$ the lines became so broad and weak that it was difficult to measure them accurately; moreover the list of possible $\sin^2 \theta$ was so crowded that it became increasingly difficult to assign the indices of a given

Table 1

Powder photographs of Th(OH)₂CrO₄H₂O. Cr K α -radiation.

$$\lambda = 2.286 \text{ kX} = 2.291 \text{ \AA}$$

<i>h k l</i>	<i>I</i> _{calc}	10 ⁴ sin ² θ _{calc}	10 ⁴ sin ² θ _{obs}	<i>I</i> _{obs}	<i>h k l</i>	<i>I</i> _{calc}	10 ⁴ sin ² θ _{calc}	10 ⁴ sin ² θ _{obs}	<i>I</i> _{obs}
2 0 0	$\frac{1}{2} \cdot 12$	1065	—	—	3 1 0	2	2747	—	—
1 0 2	$\frac{1}{2} \cdot 140$	1092	1089	st	2 2 2	27	2819	—	—
1 1 1	159	1181	1174	m	1 1 3	55	2834	2841	w +
2 1 1	166	1265	1257	m	2 1 3	0	2918	—	—
0 0 2	$\frac{1}{2} \cdot 4$	1303	1304	vvw —	0 0 3	$\frac{1}{2} \cdot 25$	2932	(2937	w + β)
0 2 0	$\frac{1}{2} \cdot 159$	1404	—	—	0 3 0	0	3160	—	—
2 0 2	$\frac{1}{2} \cdot 5$	1414	1398	w	3 0 3	0	3182	—	—
2 1 0	39	1416	—	—	2 2 1	132	3271	—	—
1 1 2	3	1444	1439	vvw	0 1 3	110	3283	3287	m
0 1 2	94	1654	1647	m	2 0 2	$\frac{1}{2} \cdot 146$	3321	3325	vw
1 2 0	0	1671	—	—	3 2 1	126	3411	—	—
0 2 1	64	1730	1721	vw	1 3 0	100	3426	3419	w
1 2 1	42	1758	1758	w	3 0 1	$\frac{1}{2} \cdot 21$	3436	—	—
2 1 2	41	1766	—	—	1 2 2	66	3450	3447	vvw
2 0 1	$\frac{1}{2} \cdot 52$	1867	1859	vw	0 3 1	12	3486	—	—
3 0 1	$\frac{1}{2} \cdot 83$	2006	(1999	vw + β	1 3 1	7	3514	—	—
1 0 2	$\frac{1}{2} \cdot 46$	2046	(2040	vw + β	3 1 3	156	3534	3538	m
2 1 1	3	2218	—	—	4 0 1	$\frac{1}{2} \cdot 66$	3631	(3629	vw + β
1 2 1	6	2235	—	—	4 0 2	$\frac{1}{2} \cdot 121$	3655	3658	vw
3 0 2	$\frac{1}{2} \cdot 28$	2269	2263	vvw	2 1 2	19	3672	—	—
2 2 1	10	2318	—	—	3 2 2	2	3673	—	—
3 1 1	6	2357	—	—	3 1 1	40	3787	—	—
3 0 0	$\frac{1}{2} \cdot 102$	2396	2403	w	3 2 0	154	3800	3798	w
1 1 2	30	2397	—	—	1 2 3	35	3887	3895	vvw
2 2 0	53	2469	2475	vw	1 0 3	$\frac{1}{2} \cdot 137$	3913	3920	w
1 0 3	$\frac{1}{2} \cdot 1$	2483	—	—	2 2 3	121	3971	—	—
1 2 2	154	2497	2500	w +	4 1 1	42	3982	3982	w +
2 0 3	$\frac{1}{2} \cdot 137$	2566	2570	m	1 3 1	123	3990	—	—
3 1 2	76	2620	2628	w —	4 1 2	0	4006	—	—
0 2 2	8	2707	—	—	2 3 1	154	4074	4075	vw

The powder photographs have been measured and interpreted to $\sin^2 \theta = 0.7$. The horizontal line marks the boundary between the angular ranges of two different focussing cameras. Because of the shape of the crystals (flat needles) there is an orientation effect favouring reflections with low *k*.

line with certainty, even when later on the atomic positions were known and thus the intensities could be calculated.

The mean value for the density of the crystals is 4.35, from which we calculated that there are $1.94 \approx 2$ formula units $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$ per unit cell.

The only reflections absent systematically are $0k0$ with $k = \text{odd}$, which is characteristic of the two space groups C_2^2 and C_{2h}^2 .

Since we could assign a plausible structure assuming C_{2h}^2 , the space-group of higher symmetry, we did not consider the low-symmetrical C_2^2 .

In C_{2h}^2 the following point positions are possible:

$$\begin{array}{ll} 2(a): 000; 0\frac{1}{2}0 & 2(b): \frac{1}{2}00; \frac{1}{2}\frac{1}{2}0 \\ 2(c): 00\frac{1}{2}; 0\frac{1}{2}\frac{1}{2} & 2(d): \frac{1}{2}0\frac{1}{2}; \frac{1}{2}\frac{1}{2}\frac{1}{2} \\ 2(e): \pm(x\frac{1}{4}z) & 4(f): \pm(xyz); \pm(x, \frac{1}{2}-y, z) \end{array}$$

Positions of the heavy atoms

In order to determine the positions of the heavy atoms (two Th and two Cr per unit cell) we calculated the following functions:

$$P_0(u, w) = \sum_h \sum_l I_{h0l} \cos 2\pi(hu + lw) \approx \sum_h \sum_l F_{h0l}^2 \cos 2\pi(hu + lw) = P(upw) \quad (1)$$

$$P_1(u, w) = \sum_h \sum_l I_{h1l} \cos 2\pi(hu + lw) \approx \sum_h \sum_l F_{h1l}^2 \cos 2\pi(hu + lw) \quad (2)$$

using the observed intensities of the WEISSENBURG photographs. The first of the functions, $P_0(u, w)$, is approximately the projection $P(upw)$ of the PATTERSON function on the uw plane. Now, whichever twofold point positions in C_{2h}^2 the Th and Cr atoms occupy, it can be seen that for any set of h and l

$$\begin{aligned} F_{h0l}^2 &= F_{h2l}^2 = F_{h4l}^2 = \dots = F_{h,2n,l}^2 \\ F_{h1l}^2 &= F_{h3l}^2 = F_{h5l}^2 = \dots = F_{h,2n+1,l}^2 \end{aligned}$$

in so far as the scattering from the lighter atoms (O and H) and the variation of f_{Th} and f_{Cr} with θ can be neglected. For instance, the sequence of the intensities in the $h2l$ was found to be very similar to that of the $h0l$.

Accordingly, for the two cuts of the PATTERSON function at $v = 0$ and $v = \frac{1}{2}$, the following approximate relations hold:

$$\begin{aligned} P(u0w) &= \sum \sum \sum F_{hkl}^2 \cos 2\pi(hu + lw) \approx c_1 \sum \sum F_{h0l}^2 \cos 2\pi(hu + lw) + \\ &+ c_2 \sum \sum F_{h1l}^2 \cos 2\pi(hu + lw) \approx c_3 P_0 + c_4 P_1 = \text{const} (P_0 + c P_1) \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} P(u\frac{1}{2}w) &= \sum \sum \sum F_{hkl}^2 \cos [2\pi(hu + lw) + \pi k] \approx c_1 \sum \sum F_{h0l}^2 \cos 2\pi(hu + lw) - \\ &- c_2 \sum \sum F_{h1l}^2 \cos 2\pi(hu + lw) \approx c_3 P_0 - c_4 P_1 = \text{const} (P_0 - c P_1) \end{aligned} \quad (4)$$

Since in the calculation of P_0 and P_1 the arbitrary scales of the intensities were so chosen that the intensities of the strongest reflections were the same (50) in both $h0l$ and $h1l$, the constant c can be expected to be about unity.

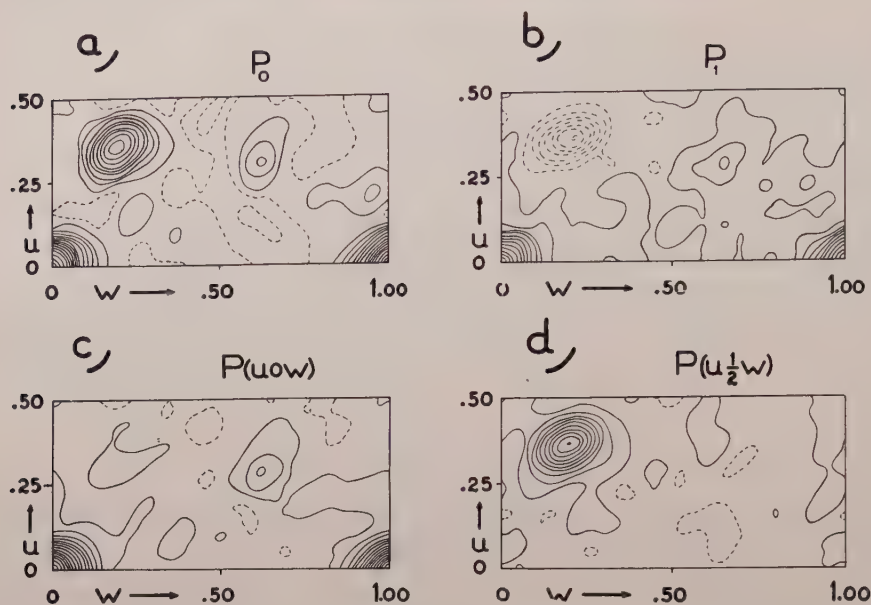


Fig. 1. PATTERSON analysis of $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$. a) Sum $P_0 \approx P(u w)$, defined by (1). b) Sum P_1 , defined by (2). c) $P_0 + 1.30 P_1 \approx P(u w)$, according to (3). d) $P_0 - 1.30 P_1 \approx P(u \frac{1}{2} w)$, according to (4). In the maps, dotted lines indicate negative values.

In Fig. 1 a-d the four functions

$$P_0(u w)$$

$$P_1(u w)$$

$$P_0 + 1.30 P_1 \approx P(u w) \quad (5)$$

$$P_0 - 1.30 P_1 \approx P(u \frac{1}{2} w) \quad (6)$$

are drawn for $0 \leq u \leq \frac{1}{2}$ and $0 \leq w \leq 1$, which is a sufficient range since the unit cell has a symmetry centre. Except, of course, at the origin, $P_0(u, w)$ has a high peak at $u = .36$ $w = .20$, which certainly corresponds to the projection of the only Th-Th vector in this half-cell. Since at the corresponding position P_1 has a deep pit with very low negative values (Fig. 1 b), it can be concluded that the peak occurs at $v = \frac{1}{2}$ (c.f. (4) and Fig. 1 d). The factor 1.30 in (5) and (6) was chosen so that the peak in P_0 and the pit in P_1 exactly cancelled out for $v = 0$.

The Th-Th peak at $(.36, \frac{1}{2}, .20)$ can be explained only if the Th atoms occupy 2(e):

$$2 \text{ Th in } 2 \text{ (e), } x \approx .18, z \approx .10$$

whereas all the other four twofold point positions of C_{2h}^2 would demand a Th-Th distance corresponding to a maximum in P at $0 \frac{1}{2} 0$.

In the maps in Fig. 1 c or 1 d the next highest peak is that at $(.29 \ 0 \ .63)$. It is probably real since it occurs in both P_0 (Fig. 1 a) and P_1 (Fig. 1 b).

It is reasonable to ascribe this peak to a Th-Cr distance, from which follows that the Cr atoms occupy 2(e) either with I) $x = .89$, $z = .47$ or with II) $x = .47$, $z = .73$. Now, of these two sets of parameters I would demand a Th-Cr maximum at $(.07 \frac{1}{2} .57)$, and II one at $(.35 \frac{1}{2} .17)$. A survey of $P(u \frac{1}{2} w)$ (Fig. 1d) shows that I is ruled out, since there is no maximum in the position expected. On the other hand, the maximum demanded by II is concealed in the huge Th-Th peak at $(.36 \frac{1}{2} .20)$. We thus conclude:

2 Cr in 2(e), $x = .47$, $z = .73$

In this way the PATTERSON maps are well explained, which does not seem possible with any other point position in C_{2h}^2 ; Cr atoms in any of 2(a)-2(d) would, for example, demand maxima in P in positions where none are observed.

Already with these approximate parameters for Th and Cr fairly good agreement was obtained between observed and calculated intensities of the $h0l$ and $h1l$ (neglecting the contribution of the O atoms). By systematic variation of the parameters, the best agreement was found for

2 Th in 2(e), $x = .178$, $z = .108$

2 Cr in 2(e), $x = .47$, $z = .72$

Positions of the oxygen atoms

Forbidden domains

The positions of the oxygen atoms could not be determined from the intensities, but had to be found from considerations of the interatomic distances.

We assumed that the Cr atoms are the centres of CrO_4^{2-} groups, which are regular tetrahedra with the distances $\text{Cr-O} = 1.6_0 \text{ \AA}$ and $\text{O-O} = 2.6_1 \text{ \AA}$ (ZACHARIASEN and ZIEGLER 1931; MILLER 1936; CLOUSE 1932 found 1.6_4 and $2.6_8 \text{ \AA}$). Moreover, we assumed that the distances between any two oxygen atoms (either from O^{2-} , OH^- , H_2O or CrO_4^{2-}) cannot be less than $2.60 \text{ \AA}$ and that the Th-O distances are not less than $2.40 \text{ \AA}$. (In ThO_2 , GOLDSCHMIDT and THOMASSEN, 1923, found a coordination Th-8 O and a distance $\text{Th-O} = 2.41 \text{ \AA}$.) It seems to us that neither of these assumptions can be far from the truth.

There are two symmetry planes in the unit cell, at $y = \pm .25$. If an O atom is not situated exactly in a symmetry plane it must be at a distance of at least $1.30 \text{ \AA}$ from it. Accordingly, the y coordinates of the atoms should be either $y = .25$ and $y = .75$, or within the rather narrow limits $-.04 \leq y \leq .04$ and $.46 \leq y \leq .54$.

Moreover, there are eight symmetry centres per unit cell, namely the points of the twofold positions 2(a)-2(d). If an oxygen centre does not coincide with a symmetry centre, it must be outside a sphere of radius $1.30 \text{ \AA}$ around it. Spheres of $2.40 \text{ \AA}$ radius around the Th atoms and of $2.60 \text{ \AA}$ radius around such O atoms as have been located also constitute forbidden domains for the oxygen centres.

Since every Cr atom is situated in a symmetry plane, the only way to accommodate a regular CrO_4 tetrahedron is if one edge is in the same symmetry plane as Cr and the opposite edge perpendicular to that plane. Let us consider a CrO_4 group with Cr at $y = .25$. If the "forbidden" sphere of radius $2.60 \text{ \AA}$ is drawn around each O centre, the sections at $y = 0$ and $y = .25$ will be as shown in Fig. 2a and 2b.

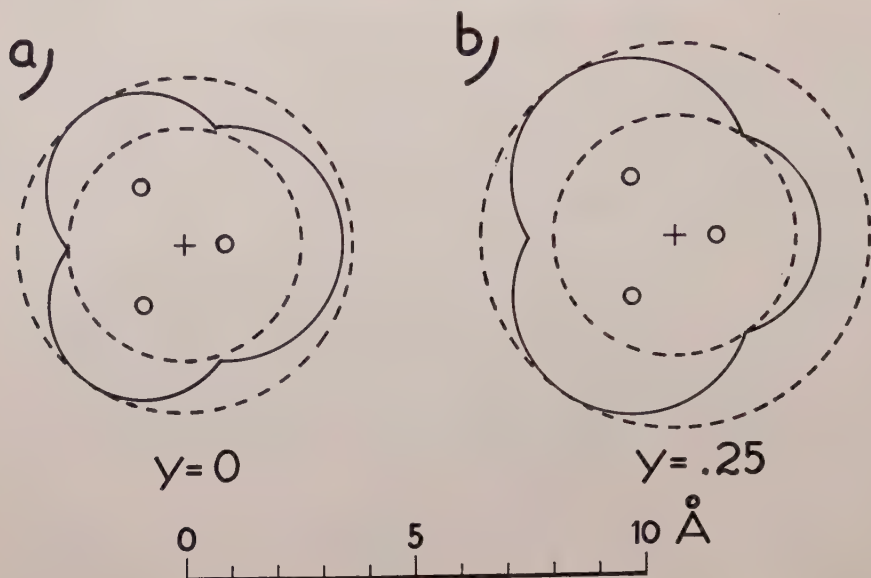


Fig. 2. Sections at a) $y = 0$ and b) $y = .25$, showing the forbidden domains around a chromate group with Cr in the plane $y = .25$
 + = (projection of) Cr centre, O = (projection of) O centre.

If the CrO_4 group is rotated around an axis passing through the Cr atom and parallel to the y axis, we observe that the areas inside the inner dotted circles are always forbidden for O centres, whereas outside the outer dotted circles there is no hindrance from this special CrO_4 group.

Non-chromate oxygen atoms

In addition to the 8 O atoms in the CrO_4 groups there are 6 others in the unit cell. To get some information about their positions we constructed sections for $y = 0$ and $y = .25$, marking out the forbidden areas around the symmetry centres, Th atoms, and CrO_4 groups (Fig. 3 a and 3 b). It should be remembered that in Fig. 3 a above and below the section $y = 0$ there is a certain free domain ($y = \pm .04$), whereas in Fig. 3 b the atoms are restricted to the single plane $y = .25$. For $y = 0 \pm .04$ there are two small domains in the neighbourhood of the points P and Q at the intersections of the Th-O circles, where an oxygen centre can lie for any position of the CrO_4 groups. The points P and Q are not independent but belong to the same fourfold point position. O atoms at P and Q would incidently be in contact at the symmetry centre in the origin. The shaded areas in both sections may be permitted, but only for certain positions of the CrO_4 groups (cf Fig. 2 a and b). The rest of the areas are forbidden.

Now it is not likely that all the six non-chromate oxygen atoms are situated in the planes $y = \pm .25$ (thus in twofold positions) because there would then be an accumulation of negatively charged particles. Thus there must be some oxygens at $y \approx 0$. Since they must be strongly attracted by the Th^{4+} ions it seems very

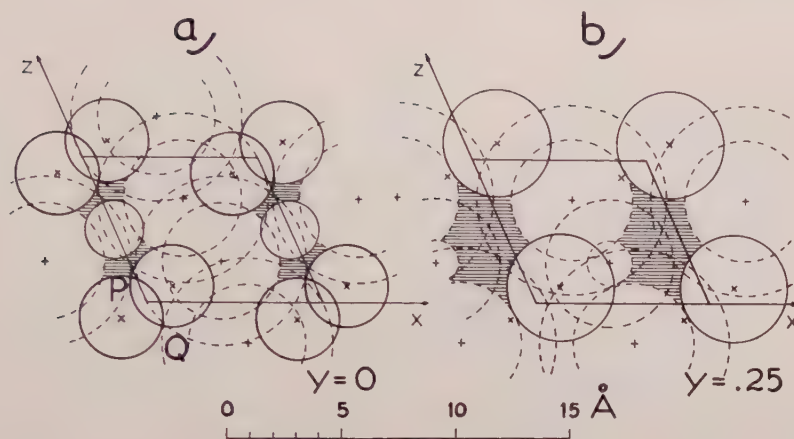


Fig. 3. Sections at a) $y = 0$ and b) $y = .25$ through a unit cell, showing the areas forbidden for the centres of non-chromate oxygen atoms (see text, page 284).

+ = (projection of) Cr. × = (projection of) Th.

improbable that they would be somewhere else and leave the positions P and Q free. We thus assume that four oxygen atoms occupy a fourfold position

$$4 \text{ O in } 4(f), x = .97, y \approx 0, z = .18.$$

The two remaining non-chromate oxygen atoms will be dealt with below.

Chromate oxygen atoms

As was mentioned above, the CrO_4 tetrahedra have one edge in the planes $y = \pm .25$ and the opposite one perpendicular to them. The eight chromate oxygens thus occupy two positions 2(e) and one position 4(f). If the CrO_4 groups are assumed to be regular tetrahedra with the distances $\text{O}-\text{O} = 2.6_1 \text{ \AA}$, then their positions are fixed except for one angular parameter. If a CrO_4 group with Cr at $y = .25$ is rotated about an axis passing through the Cr atom and parallel to the y axis, the O atoms all move on circles: two in the plane $y = .25$ on circles with radius $= 1.6_0 \text{ \AA}$ and the others in the planes $y = .04$ and $.46$ on circles with radius $= .9_3 \text{ \AA}$ (= the projection on the xz plane of the distance $\text{Cr}-\text{O}$).

These circles are drawn thick in Fig. 4 a and 4 b, which show the sections of the unit cell at $y = .04$ and $y = .25$. In these figures the forbidden areas around the Th atoms and around the symmetry centres are shown as thin circles. The oxygen atom at $y = .04$ can be situated only at the points (or rather short arcs) 1 or 2 or on the long arc 3-4. If this oxygen atom were situated somewhere on 3-4 it would have no contact with the Th atoms; moreover the O atoms in $y = .25$ would be situated on the right semi-circle far from the Th atoms. Of the four O atoms in a CrO_4 group, at most one would then be in contact with a Th atom, and the co-ordination number of Th would be at most 5, which is not probable. The two points 1 and 2 are much more probable, since in these positions the O atom would be supported by a Th atom as well as by an O atom belonging to another CrO_4 group. The corresponding chromate oxygen atoms at $y = .25$ ($1'-1''$ and $2'-2''$ in Fig.

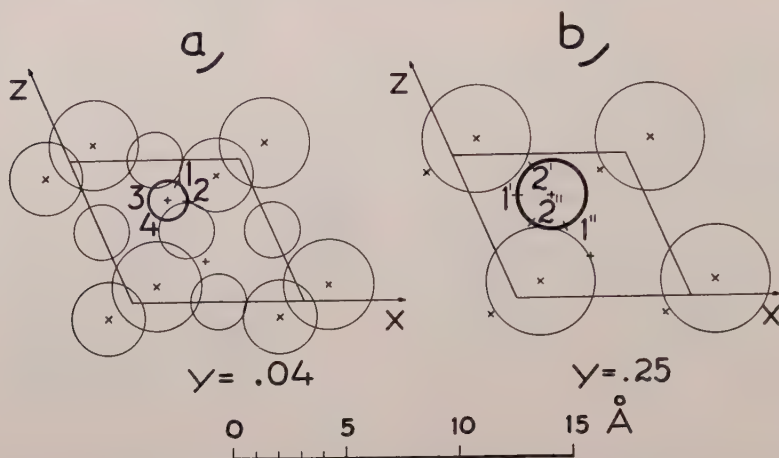


Fig. 4. Sections at a) $y = .04$ and b) $y = .25$ through the unit cell. Thin circles contain domains forbidden for chromate oxygen atoms. The thick circles are generated by one chromate oxygen centre in a) and by two in b) if the CrO_4 group is rotated. (As for the points 1, 2 etc., see page 285).

+ = (projection of) Cr. × = (projection of) Th.

4 b) would also be rather close to thorium atoms; the Th–O distances in this plane would be $\approx 2.9 \text{ \AA}$ and $2.6 \text{ \AA}$ for $1'$ and $1''$ and $\approx 2.7 \text{ \AA}$ and $2.6 \text{ \AA}$ for $2'$ and $2''$. We are inclined to prefer alternative 2, since this will give a closer approach Th–O at $y = .25$. We thus assume:

4 O in 4 (f)	$x = .59$	$y = .04$	$z = .72$
2 O in 2 (e)	$x = .43$	$z = .93$	
2 O in 2 (e)	$x = .27$	$z = .51$	

However, alternative 1 cannot be said to be altogether excluded.

For the two remaining O atoms there is certainly no room in the domain $y = 0 \pm .04$. They must thus be in a twofold point position 2 (e) at $y = \pm .25$. Fig. 5 shows a section at $y = .25$ with the areas forbidden by those oxygen atoms that have already been located. As is seen, there is a rather large area (shaded) left free for an oxygen centre. Since it was not possible to determine its position accurately, we assumed its average position to be in the centre of the free area. For reasons to be given below we shall denote this oxygen atom by O_{aq} .

$$2 \text{ O}_{\text{aq}} \text{ in } 2 (\text{e}), \quad x = .75 \quad z = .40.$$

Distribution of the hydrogen atoms

There are eight hydrogen atoms per unit cell. Even if a H atom forms a hydrogen bond between two O atoms, it is believed to be closer to one of them. If the space group is retained, the 8 H could be distributed in the following ways over the CrO_4 groups, the 4 O_{Th} , and the 2 O_{aq} atoms:

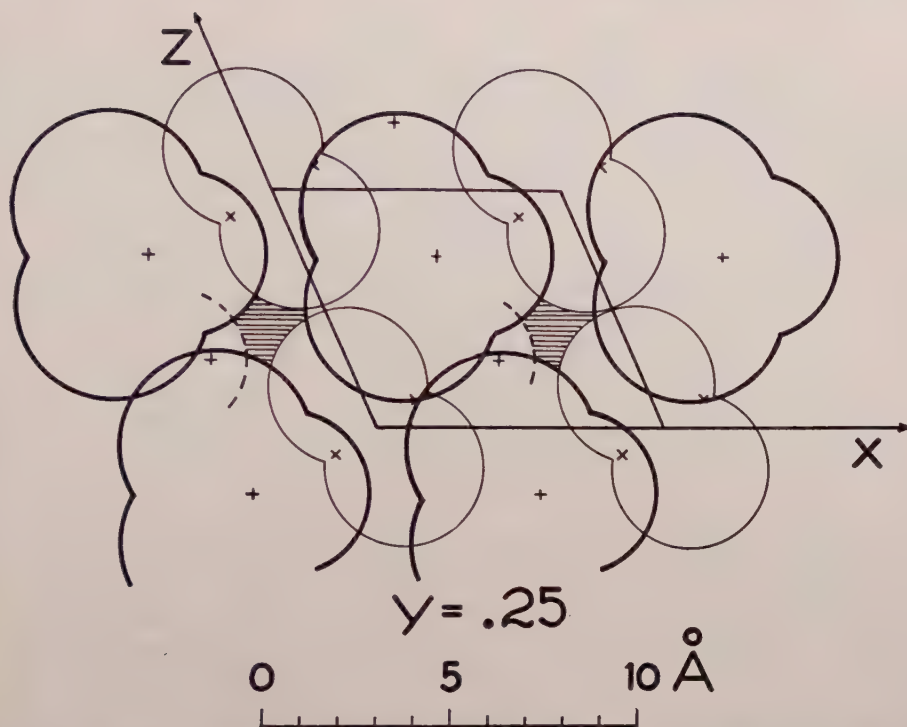


Fig. 5. Section at $y = .25$ through the unit cell. All areas except the shaded ones are forbidden for the centre of an O_{aq} .

+ = centre of Cr. x = centre of Th.

	I	II	III	IV	V	VI
O_{Cr}	$2 H_2CrO_4$	$2 H_2CrO_4$	$2 HCrO_4^-$	$2 HCrO_4^-$	$2 CrO_4^{2-}$	$2 CrO_4^{2-}$
O_{Th}	$4 OH^-$	$4 O^{2-}$	$4 OH^-$	$4 O^{2-}$	$4 H_2O$	$4 OH^-$
O_{aq}	$2 O^{2-}$	$2 H_2O$	$2 OH^-$	$2 H_3O^+$	$2 O^{2-}$	$2 H_2O$

It should be remembered that the O_{aq} are not in direct contact with any metal ion Cr^{6+} or Th^{4+} . Their proton affinity can thus be supposed to be practically the same as if they were free in solution. Then it seems very improbable that the O_{aq} would consist of O^{2-} ions whereas H_2O molecules (with O_{Th}) would be close to the Th (case V) or that the O_{aq} would be free OH^- or O^{2-} although they are in contact with $HCrO_4^-$ or H_2CrO_4 groups (cases I and III). In cases I and III a shift of the protons to the positions of case VI can for this reason be expected. In cases II and IV the structure would consist of electrically neutral chains $(ThO_2)_n$, with H_3O^+ and $HCrO_4^-$ or H_2O and H_2CrO_4 between them. This structure seems very peculiar.

The only probable distribution of the H atoms thus seems to be VI.

The H atoms at the O_{Th} may form hydrogen bonds with the O_{Cr} , and those of the O_{aq} with one or two of the O_{Cr} . In such a case they would be in the lines joining the O centres. However, we cannot determine with certainty the parameters of the H atoms.

Final structure proposition

Now that the positions of the O atoms had been determined, the Th and Cr parameters were recalculated from the intensities of the $h\ 1\ l$, considering also the scattering power of the O atoms. Only small corrections in the original values were needed and consequently no redetermination of the O positions was necessary.

Table 2

Calculated and observed intensities of $h\ 1\ l$ from WEISSENBERG photograph of Th(OH)₂CrO₄H₂O. Cu K α radiation

$$I_{\text{calc}} = 100 \left(\frac{F}{2f_{\text{Th}}} \right)^2$$

	<i>h</i>											
<i>l</i>	$\bar{6}$	$\bar{5}$	$\bar{4}$	$\bar{3}$	$\bar{2}$	$\bar{1}$	0	1	2	3	4	5
0							—	94	39	2	130	10
								m	w—	—	w	—
1	0	104	42	6	166	2	12	159	3	40	94	7
	—	vw	vvw	—	m	vvw?	vw	m	—	vw	w	—
2	49	94	0	76	41	3	94	30	19	120	2	
	—	vw	—	vw	vw	—	w	vw	vvw?	w	—	
3	128	10	11	156	0	55	110	12	79	45		
	vw	—	—	w	—	vw	w	—	vvw	vvw		
4		15	98	14	15	116	0	19	121			
		—	vw	vvw	—	vw	—	—	vw			
5			112	5	66	96	35					
			vw	—	—	vvw	—					

Table 3

Calculated and observed intensities of $h\ 0\ l$ from WEISSENBERG photograph of Th(OH)₂CrO₄H₂O. Cu K α radiation

$$I_{\text{calc}} = 100 \left(\frac{F}{2f_{\text{Th}}} \right)^2$$

	<i>h</i>												
<i>l</i>	$\bar{6}$	$\bar{5}$	$\bar{4}$	$\bar{3}$	$\bar{2}$	$\bar{1}$	0	1	2	3	4	5	6
0							—	1	12	102	4	81	56
								vvw	vw	m	—	vw	vvw
1	144	2	66	83	1	88	59	2	52	21	23	175	
	vw	—	w	w	—	m	m	—	w+	vvw?	—	w	
2	20	15	121	28	5	140	4	46	146	19	89		
	—	—	w	vvw	—	m	—	vw	m	—	vw		
3		78	69	0	137	1	25	137	8	27	76		
		vvw	vw	—	w+	—	vvw	m	—	—	vvw		
4		112	0	44	114	10	55	88	24				
		vw	—	—	vw	—	vvw	vw	—				
5			39	144	5	17	125						
			—	vw	—	—	vw						

In Tables 2 and 3 the calculated values of $100 \left(\frac{F}{2f_{\text{Th}}} \right)^2$ are compared with the observed intensities of the reflections in the WEISSENBERG photographs $h\ 1\ l$ and

h 0 l. The agreement is rather good, bearing in mind that there is a general weakening of the intensities with increasing θ .

We thus propose the following structure for $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$:

$\text{C}_{2h}^2\text{-P } 2_1/m$, 2 formula units per cell.

	x	y	z
2 Th in 2 (e)	$.183 \pm .005$	.25	$.113 \pm .005$
2 Cr in 2 (e)	$.47 \pm .02$	.25	$.72 \pm .02$
4 $\text{O}_{\text{Th}}(\text{OH})$ in 4 (f)	.97	$0 \pm .04$	.18
4 O_{Cr_1} in 4 (f)	.59	.04	.72
2 O_{Cr_2} in 2 (e)	.43	.25	.93
2 O_{Cr_3} in 2 (e)	.27	.25	.51
2 $\text{O}_{\text{aq}}(\text{H}_2\text{O})$ in 2 (e)	.75	.25	.40
$2 (e) = \pm (x \frac{1}{4} z)$			
$4 (f) = \pm (x y z), \quad \pm (x \frac{1}{2} - y z)$			

The accuracy of the oxygen x and z parameters is estimated to be about $\pm .02$ — $.05$ for the O_{Th} and O_{Cr} , $\pm .10$ for the O_{aq} .

Description

The structure is best described as built up of infinite $[\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}]_n$ strings, and finite CrO_4^{2-} and H_2O groups.

The $[\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}]_n$ strings, which are described here for the first time, contain two almost parallel rows of OH^- groups. The Th atoms are situated on alternate sides of the OH "ribbon", in such a way that every Th is in contact with 4 OH (forming almost a square) and every OH with two Th (Fig. 6).

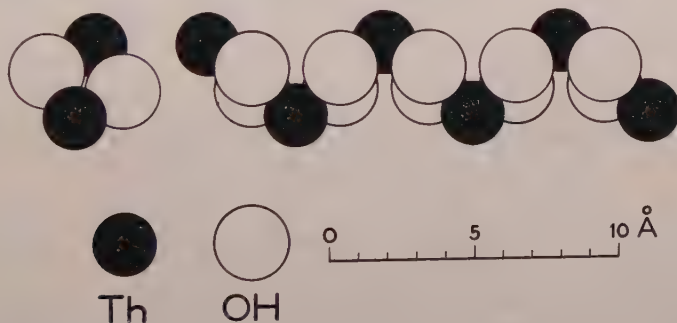


Fig. 6. The $[\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}]_n$ chain viewed along $[010]$ (left) and from the side (right).

The $[\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}]_n$ strings can be compared to a rib cut out from a $(\text{BiO}^+)_n$ sheet in the bismuth oxy compounds, where a quadratic sheet of oxygen atoms is surrounded by Bi atoms on both sides (BANNISTER and HEY, SILLÉN, *l.c.*). One might also imagine similar strings cut out from the crystal structure of ThO_2 (which has the CaF_2 structure, GOLDSCHMIDT and THOMASSEN, *l.c.*).

The $[\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}]_n$ strings run in the direction of the y axis. Between them the CrO_4^{2-} groups are packed in such a way that every Th atom is in contact with four oxygen atoms belonging to four different chromate groups and forming approxi-

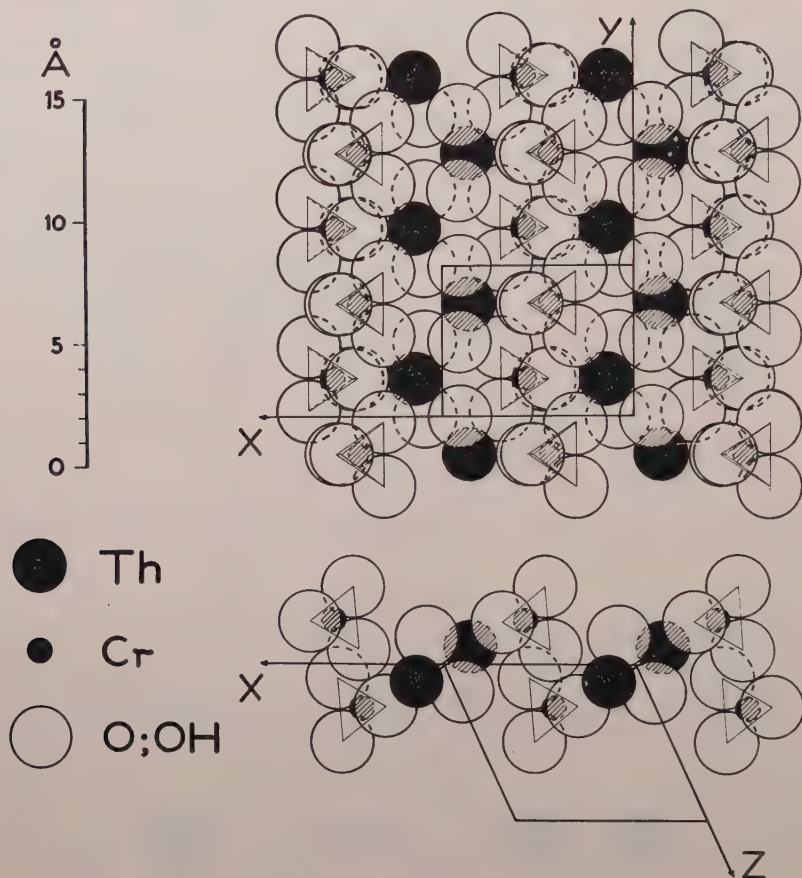


Fig. 7. Structure of $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$, projected on the xy plane. Part of the xz projection is drawn below. The size of a unit cell is marked off in both projections. The $[\text{Th}(\text{OH})_2]^{2+}_n$ chains run along the y axis. The CrO_4^{2-} tetrahedra have been marked out. For clearness, the water molecules have not been indicated.

mately a quadrate at an angle of 45° to the OH quadrate. The coordination Th-O is thus eightfold with an average distance of $2.5 \text{ \AA}$.

The water molecules, finally, occupy the largest holes remaining in the structure. The xy and xz projections of the structure are shown in Fig. 7 and 8.

With the atomic parameters given, the distances Th-O would be (in $\text{\AA}$)

$$\begin{aligned} \text{Th}-4 \text{ O}_{\text{Th}}, \text{ O}_{\text{Th}}-\text{Th} &= 2.4 \\ \text{Th}-2 \text{ O}_{\text{Cr}}, \text{ O}_{\text{Cr}}-\text{Th} &= 2.4 \\ \text{Th}-\text{O}_{\text{Cr}_2}, \text{ O}_{\text{Cr}_2}-\text{Th} &= 2.6_8 \\ \text{Th}-\text{O}_{\text{Cr}_3}, \text{ O}_{\text{Cr}_3}-\text{Th} &= 2.5_6 \end{aligned}$$

The distances within the CrO_4 groups have all the time been assumed to be $\text{Cr}-4 \text{ O}_{\text{Cr}} = 1.6 \text{ \AA}$, $\text{O}_{\text{Cr}}-3 \text{ O}_{\text{Cr}} = 2.6 \text{ \AA}$.

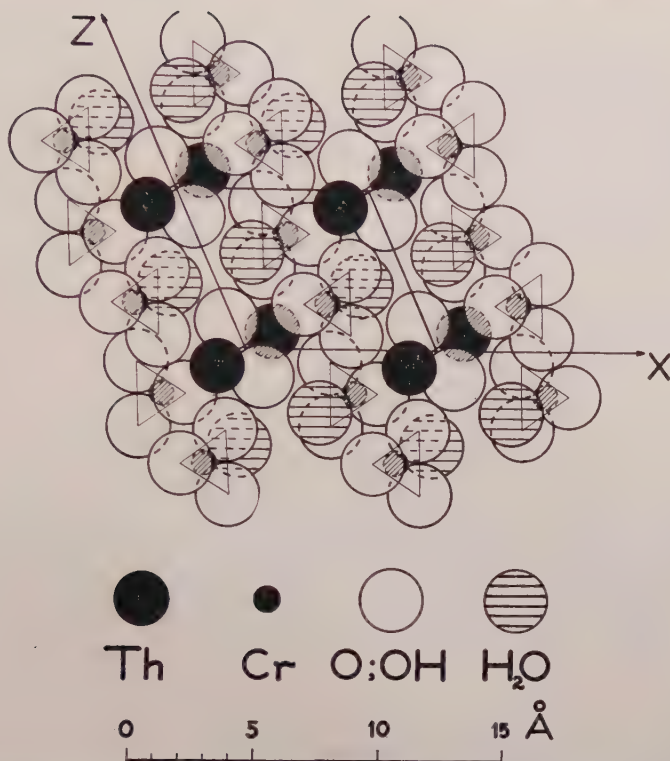


Fig. 8. Structure of $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$, projected on the xz plane. The $[\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}]_n$ chains are seen from above. The CrO_4^{2-} tetrahedra look like triangles since two oxygen atoms coincide in this projection.

The O—O distances for O_{Th} and O_{Cr} would be as follows (in Å)

$$\begin{aligned} \text{O}_{\text{Th}}-3 \text{O}_{\text{Th}} &= 2.7_2, \quad 2 \times 3.0_5 \\ \text{O}_{\text{Th}}-2 \text{O}_{\text{Cr}_1}, \quad \text{O}_{\text{Cr}_1}-2 \text{O}_{\text{Th}} &= 3.1_4, \quad 3.3_2 \\ \text{O}_{\text{Th}}-\text{O}_{\text{Cr}_2}, \quad \text{O}_{\text{Cr}_2}-2 \text{O}_{\text{Th}} &= 3.2_2 \\ \text{O}_{\text{Th}}-\text{O}_{\text{Cr}_3}, \quad \text{O}_{\text{Cr}_3}-\text{O}_{\text{Th}} &= 2.9_4 \\ \text{O}_{\text{Cr}_1}-\text{O}_{\text{Cr}_1} &= 2.8_4 \\ \text{O}_{\text{Cr}_1}-\text{O}_{\text{Cr}_2}, \quad \text{O}_{\text{Cr}_2}-2 \text{O}_{\text{Cr}_1} &= 3.0_6 \\ \text{O}_{\text{Cr}_1}-\text{O}_{\text{Cr}_3}, \quad \text{O}_{\text{Cr}_3}-2 \text{O}_{\text{Cr}_1} &= 2.8_6 \end{aligned}$$

These figures are all within the normal range showing that the lattice is supported by O—O contacts also. However, they may be inaccurate by one or a few .1 Å, because the oxygen positions could not be determined very accurately.

For the O_{aq} the distances to their nearest neighbours would be (in Å):

$$\begin{aligned} \text{O}_{\text{aq}}-2 \text{O}_{\text{Th}} &3.1_0 \quad 3.2_4 \\ \text{O}_{\text{aq}}-2 \text{O}_{\text{Cr}_1} &2.9_8 \quad 3.2_1 \\ \text{O}_{\text{aq}}-2 \text{O}_{\text{Cr}_2} &(3.6_2) \\ \text{O}_{\text{aq}}-2 \text{O}_{\text{Cr}_3} &3.1_4 \end{aligned}$$

These values are still somewhat more uncertain than the other O—O distances.

We wish to thank Professor GUSTAF LJUNGGREN for the helpful interest he has shown in this work. Part of the work was aided by a grant from Atomkommittén.

We are indebted to the Rector of the University, Professor SVEN THUNBERG, and to Professor ARNE ÖLANDER, for providing us with laboratory facilities.

In the practical X-ray work, Mr. SVEN SAHLQVIST has been an invaluable aid. We have had many valuable discussions with Mr. ERIK EKEDAHN.

Summary

$\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\text{H}_2\text{O}$ has a primitive monoclinic cell with

$$\begin{aligned} a &= (7.66_2 \pm .01) \text{ kX} = (7.67_7 \pm .01) \text{ \AA} \\ b &= (6.10_1 \pm .01) \text{ kX} = (6.11_3 \pm .01) \text{ \AA} \\ c &= (6.92_6 \pm .01) \text{ kX} = (6.94_0 \pm .01) \text{ \AA} \\ \beta &= 113.87 \pm .10^\circ \end{aligned}$$

A structure is proposed with atomic positions in C_{2h}^2 (see p. 289). The positions of the Th and Cr atoms have been determined by means of the intensities of the X-ray reflections. The positions of the O atoms have been deduced by a systematic argument, where the shape of the CrO_4 group and the minimum permissible distances O—O and Th—O have been assumed to be the same as in previously determined crystal structures. No other oxygen arrangement seems to be as plausible as that given. The structure is built up of infinite zig-zag formed chains of composition $[\text{Th}(\text{OH})_2^+]_n$ (Fig. 6), with finite CrO_4 groups between them. The additional water is contained in holes in the lattice (Fig. 7-8).

Each Th atom is surrounded by 8 O atoms (4 OH and 4 chromate oxygen atoms) at an average distance of 2.5 Å.

Note: In all the figures, a left handed coordinate system has been used.

Försvarets forskningsanstalt, avd. 1.

Inst. of Inorganic and Physical Chemistry, University, Stockholm.

References: Bannister, F. A. and Hey, M. H. (1935) *MinerMag* 24, 49. — Britton, H. T. S. (1923) *JCS* 123, 1429. — — (1926) *JCS* 125. — Brush, G. J. (1868) *AmerJSci* 46, 240. — Brönsted, J. N. and Volqvartz, K. (1928) *ZphCh* 134, 97. — Clouse, J. H. (1932) *ZKrist* 83, 161. — Faucherre, J. and Schaal, R. (1947) *BullSCFr*, 927. — Gmelin—Kraut, *Handbuch der anorganischen Chemie* (7 Aufl.) VI: 1 (1928) pp. 181–182 and 873. — Goldschmidt, V. M. and Thomassen, L. (1923) *VidSelskSkr MN*, no 2; *Strukturbericht* 1, 208. — Granér, F. and Sillén, L. G. (1947) *ACScand* 1, 631. — Holmqvist, A. (1936) *SvKemT* 43, 106; *Diss.*, Lund, 74. — Kolthoff, I. M. and Sandell, E. B. (1936) *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis*, New York, p. 714. — Lagercrantz, Å. and Sillén, L. G. (1948) *Arkiv Kemi* 25 A, no 20. — Miller, J. J. (1936) *ZKrist* 94, 131. — Palmer, C. (1895) *AmerCJ* 17, 374. — Pedersen, K. J. (1945) *DanskeVidSM* 22, no 10, (CA 1946, 4588⁷). — Penfield, S. L. (1894) *AmerJSci* (3) 48, 30, *ZanorgCh* 7, 22. — Sillén, L. G. (1940) *Diss.*, Stockholm. — (1942) *Naturwiss.* 30, 318. — Zachariasen, W. H. and Ziegler, G. E. (1931) *ZKrist* 80, 164.

Tryckt den 6 augusti 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Biochemische Wirkungen des Streptomycins und des Streptidins

Von HANS VON EULER und LEO HELLER

Darstellung und Eigenschaften des Streptomycins sind von dessen Entdecker, SELMAN A. WAKSMAN, zusammenfassend beschrieben worden¹ und dem gleichen Autor verdankt man eine vollständige Übersicht über die ausserordentlich reiche Streptomycin-Literatur, die in 4 Jahren bereits erschienen ist.²

Wir können also auf die erwähnte Monographie verweisen und hier unmittelbar an die vorhergehenden Mitteilungen dieses Institutes anknüpfen, welche zunächst die Wirkungen des Streptomycins auf die Keimung grüner Pflanzen behandeln, und sodann die Fähigkeit des Streptomycins, Nukleoproteide, Nukleinsäuren und Nukleotide zu fällen.

Unsere früheren Ergebnisse können folgendermaassen zusammengefasst werden:

In Konzentrationen über 0,5 % verzögert Streptomycin (STRM) die Keimung; legt man z.B. kurz gequollene Gerstensamen auf Filtrierpapier, welches mit einer dünnen Schicht von 0,5 %iger STRM-Lösung bedeckt ist, so zeigen die Wurzeln eine stark anormale Entwicklung: sie erreichen höchstens 1/10 ihrer normalen Länge und heben sich von der Unterlage ab, so dass nur die Wurzelspitzen in Berührung mit der Lösung bleiben.

Lässt man die Gerstenkörner zunächst 20 Stunden in Wasser keimen und hierauf in einer schwächeren (ca 0,05 %igen) STRM-Lösung, so tritt ein Effekt von viel höherer Specificität ein³: Der Längenzuwachs der ersten Keimblätter ist normal, dieselben sind aber nicht grün, sondern weiss oder sie zeigen die Farbe, welche ihrem Gehalt an Carotinoiden oder Anthocyanen entspricht. STRM hindert somit die *Bildung* von Chlorophyll in keimenden Samen. Bereits fertig gebildete grüne Blätter werden nicht gebleicht. An grünen Pflanzen in STRM-haltigen Nährlösungen beobachteten wir keine Wirkung. Eine mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die chlorophylldefekten Keimblätter nur wenig Chloroplasten, fast nur Leukoplasten enthalten.⁴ STRM hemmt somit keine Teilreaktion, die von einem Vorstadium zum fertigen Chlorophyll führt, sondern seine Wirkung liegt in der Entwicklungsreihe weiter zurück. Nach GUILLERMOND⁵ werden die verschiedenen Plastiden

¹ SELMAN A. WAKSMAN, *Microbial Antagonism and Antibiotic Substances*. 2. Ed. 1947. The Commonwealth Fund.

² SELMAN A. WAKSMAN, *The Literature on Streptomycin 1944–1948*. Rutgers Univ. Press.

³ EULER, *Kemiska Arbeten*. 1947. Ny följd II. Bd. 9, 1947. — BRACCO u. EULER, *Kemiska Arbeten*, Ny följd II. Bd. 10, Oktober 1947.

⁴ M. BRACCO u. EULER, *Kem. Arbeten*, Ny följd II, Bd 10, Nov. 1947.

⁵ GUILLERMOND, *Traité de Cytologie végétale* (Paris 1933).

durch Differenzierung von Chondriosomen gebildet. Wie eine mit BRACCO ausgeführte Untersuchung zeigte, beeinflusst STRM die ersten histologischen und morphologischen Transformationen der Chondriosomen.

Den Einfluss des STRM auf die Chromoplastinbildung beleuchten einige an reifenden Tomaten ausgeführte Versuche:

Unreife grüne Tomaten wurden in Stücke verschiedener Dicke geschnitten, 10 Stücke wurden auf Filtrierpapier gelegt, welches mit einer Streptomycinlösung (3 mg/ml) getränkt war. Parallelversuche wurden mit Wasser angestellt.

3 Tage nach Beginn des Versuches waren die Tomatenschalen des Parallelversuches gelb. Dagegen war nach 3 Tagen in den STRM-behandelten Tomatenschnitten ein Übergang von grün in gelbrot noch kaum zu bemerken. Bei mikroskopischer Vitalbeobachtung der Stücke in 10 %iger Zuckerlösung zeigte sich: In den Wasserkontrollen keine Cytolyse; fast alle Platten waren in gelb—rotfarbige Chromoplasten verwandelt; fast alle Platten waren gut erhalten, alle trugen deutlich den Charakter von Chloroplasten.

Unsere Beobachtungen über die eigenartige Anti-Chlorophyll-Wirkung des Streptomycins wurde vor kurzer Zeit bestätigt durch eine Untersuchung von LUIGI PROVASOLO, S. H. HUTNER und ALBERT SCHATZ¹ an einem einzelligen Material, der Flagellate *Euglena gracilis*.

Die genannten Autoren studierten den Einfluss 1) der STRM-Konzentration, 2) der Inkubationsdauer und zwar 3) bei Proliferation und Nicht-Proliferation, sowie bei Belichtung und im Dunkeln. Mit sterilen Lösungen kamen die amerikanischen Forscher zu folgenden Ergebnissen:

Gewisse Stämme von *Euglena gracilis* erfahren durch STRM-Behandlung einen dauernden Chlorophyllverlust, ohne dass das Wachstum gehindert wird, sofern die Bedingungen der Energie- und der Kohlenstoffzufuhr solche sind, dass der Verlust durch Photosynthese kompensiert werden kann. Der Bleichungsgrad wurde proportional dem Grad der STRM-Wirkung gefunden. Sowohl sprossende als nicht sprossende Zellen, belichtete und nicht belichtete Zellen erwiesen sich gleich empfindlich gegen die Bleichwirkung des Streptomycins.

Wie schon früher mitgeteilt wurde, waren unsere an Gerstensamen gemachten Beobachtungen keineswegs auf keimende Gerste beschränkt, sondern wurden an einer grösseren Reihe anderer Samen, besonders von Krasse und von Gräsern konstatiert.²

In diesem Zusammenhang sind zwei Tatsachen hervorzuheben:

1) Isolierte Chloroplasten können aus der wässrigen Lösung mit STRM gefällt werden; das gleiche gilt von isoliertem Chloroplastin, dem natürlichen Komplex zwischen Lipo-Nukleoproteid und Chlorophyll.

2) Diese Reaktion beruht auf dem Gehalt der Chloroplasten an Nukleinsäuren bzw. Nukleoproteiden.

Als Fällungsmittel für Ribo- und Desoxyribo-Nukleinsäure übertrifft STRM die früher angewandten Fällungsmittel, nämlich Ca-Salze und Ammoniumsalze. Wählt man 0,1 %ige Ribonukleinsäurelösung als Standard, so findet man, dass die Fällungsgrenze³ bei einer STRM-Konzentration von rund 0,0005 Molarität liegt.

¹ LUIGI PROVASOLO, S. H. HUTNER u. ALBERT SCHATZ, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 69, 279 (1948).

² EULER, BRACCO u. HELLER, C. r. Acad. Sci., Paris 227, 16 (1948).

³ EULER u. HELLER ds. Ark. 26 A, Nr. 14 (1948).

Andererseits wird die Fällungsgrenze für Nukleinsäuren und ihre Derivate vom Polymerisationsgrad derselben bestimmt. Bei einem dimeren Tetranukleotid (Mol.-Gew. ca. 2 000), erhält man noch eine schwache Fällung, wogegen ein Mononukleotid z.B. Adenylsäure mit STRM nicht mehr fällbar ist. Je höher das Molekulargewicht der Nukleinsäuren bzw. Nukleoproteide ist, um so grösser ist ihre Fällbarkeit. STRM ist somit ein ausgezeichnetes Fällungsmittel für Nukleoproteide und für höhere Nukleoproteid-Komplexe, wie Lipo-Nukleoproteide, Chromo-Nukleoproteide, Virusarten (siehe z.B. S. COHEN¹) und für biologische Einheiten verschiedener Art wie Mitochondrien, Granula usw.

In Zusammenwirkung mit der differentiellen Zentrifugierung ist nach Abscheidung der „Large Granula“ von CLAUDE und der nur im Ultramikroskop sichtbaren Mikrosomen eine Isolierung möglich.

STRM als Fällungsmittel gestattet auch verschiedene Nukleoproteidderivate zu trennen.²

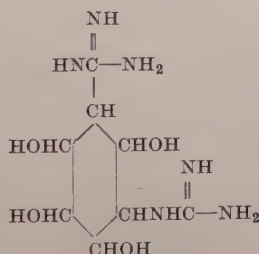
In der erwähnten Arbeit von EULER und HELLER findet man Tabellen, welche die Fällbarkeit verschiedener Nukleinsäurederivate durch STRM angeben.

Wie durch die Versuche von L. HELLER (26 A Nr. 14 S. 7) gezeigt wurde, ist die Fällbarkeit der Nukleoproteide stark von der Konzentration des zu fällenden Substrates abhängig und wird von der Gegenwart schon ziemlich geringer Konzentrationen eines neutralen Salzes beeinflusst.

Was die Spezifität der Streptomycin-Nukleinsäure-Fällung betrifft, so ist seit dem Erscheinen unserer letzten Untersuchung eine Arbeit von B. RYBAK und F. GROS³ erschienen, welche zeigt, dass ausser Nukleoproteiden und Nukleinsäuren auch noch andere Substanzgruppen, Lipide, Gerbstoffe durch STRM gefällt werden. Unter diesen ist besonders der *Komplex STRM-Cephalin* bemerkenswert.

Ein Unterschied gegenüber Nukleoproteid-STRM-Komplexen besteht hinsichtlich des Cephalin-Komplexes in dem Einfluss der Salze.

Durch die Untersuchungen von WAKSMAN und Mitarb. ist nachgewiesen worden, dass das Streptomycin in Streptobiosamin und Streptidin gespalten werden kann. Die beiden Guanidinreste, welche sich im Streptomycin-Molekül finden, sind im Streptidin ebenfalls vorhanden, und es lag also nahe zu untersuchen, ob auch Streptidin die gleiche Fähigkeit zur Fällung von Nukleoproteiden und Nukleinsäuren besitzt wie Streptomycin.



¹ SEYMOUR S. COHEN, J. Biol. Chem. 184, 511 (1947).

² Die ersten Fällungen von Nukleinsäurederivaten mit STRM sind von S. S. COHEN beschrieben worden.

³ B. RYBAK u. F. GROS. Experientia, 4, 396 (1940). — Siehe auch F. GROS, B. RYBAK, M. MACHEBEUF et U. RAMBECH, C. r. 226, 1550 (1948).

Solche Versuche hat COHEN (l. c. S. 516) mit negativem Resultat angestellt.¹ Wir haben um so mehr Veranlassung gehabt, uns in dieser Hinsicht eigene Erfahrungen zu verschaffen, als die wenigen Versuche, welche wir mit den uns zur Verfügung stehenden Mengen Streptidin anstellen konnten, eine, wenn auch verhältnismässig schwache Anti-Chlorophyll-Wirkung des Streptidins ergeben hatten.

Die Versuche waren wieder mit keimenden Gerstenkörnern (Siegergerste von Svalöf) angestellt worden. Wir benötigten *rund die 10–20fache Menge an Streptidin um einen Anti-Chlorophyll-Effekt hervorzurufen, welcher dem durch Streptomycin erzeugten quantitativ vergleichbar war.*

Unsere Resultate über die Fällungswirkung des Streptidins waren die folgenden:

Streptidin-Versuch

Das Streptidin-Präparat (Nr. 9 R 1271) verdanken wir der Firma MERCK & Co., Inc., RAHWAY, Streptidin 2 HCl theor. Mol.Gew. 335. Streptomycin-Präparat: Ca-Chlorid-Doppelsalz. Theor. Mol.Gew. 746,3.

Tabelle

*Fällung des Kern- und Mitochondrien-freien Leberextraktes
(enthält Mikrosome)*

Fällung	Endkonz. an Streptomycin		Endkonz. an Streptidin	
	4 mg/ml = 0,0054-m.	10 mg/ml = 0,0135-m.	1,8 mg/ml = 0,0054-m.	4,5 mg/ml = 0,0135-m.
	reichlich (+++)	reichlich (+++)	Spur (±)	reichlich (++)

Fällung von 0,1 % Ribonukleat mit Streptidin

	Endkonz. an Streptomycin resp. Streptidin							
	0,054-m.	0,027-m.	0,0135-m.	0,0167-m.	0,0034-m.	0,0017-m.	0,0009-m.	0,00045-m.
	(++) (+++)	(+) (+++)	(++) (+++)	— (+++)	— (++)	— (++)	— (+)	— —

Bedeutung der +-Zeichen die gleiche wie in der früheren Mitt. 26 A Nr. 14.

Die Wirkung des Streptidins ist somit bedeutend schwächer als diejenige des Streptomycins. Die fällenden Grenzkonzentrationen der beiden Substanzen für 0,1 % Ribonukleat bei pH Ca 7,5 stand im Verhältnis ca 1 : 16. (bzgl. Molaritäten).

Die fällende Grenzkonz. des Streptidins ist 9 mg/ml.

Die fällende Grenzkonz. des Streptomycins ist 1 mg/ml.

¹ S. S. COHEN schreibt: „Streptidine was incapable of forming polymers of this type. This suggests that the weak basic group of streptobiosamine is essential for lattice formation. The addition of streptomycine trihydrochloride to NaDN(p) (desoxiribonucleic acid) at pH 11.0 at concentrations for maximal precipitation did not result in precipitation.”

Lösungen:

Streptomycin-Lösung. 800 mg Streptomycin wurden in 5 ml dest. Wasser gelöst und mit einer äquimolekularen Menge von Na-Oxalat versetzt, um das Ca auszufällen. Die Fällung wurde abzentrifugiert und das klare Zentrifugat mit 0.1 n NaOH neutralisiert: Lösung auf 10 ml aufgefüllt. (1 ml entspricht 80 mg Doppelsalz.)

Streptidin-Lösung. 90 mg Streptidinhydrochlorid wurden in wenig dest. Wasser gelöst, mit 0.1 n NaOH neutralisiert und zu 2,5 ml aufgefüllt (1 ml entspr. 36 mg Streptidinhydrochlorid).

Beide Lösungen waren nahe äquimolekular, etwa 0,108 mol. bezg. der freien Basen.

Abweichend von S. S. COHEN finden wir also mit Streptidin einen zwar schwachen aber immerhin deutlichen fällenden Effekt des Streptidins. Auf die theoretische Auffassung von COHEN über den Einfluss des Netzwerkes wollen wir hier nicht eingehen. Andererseits verdient wohl der Einfluss der beiden Guanidin-Gruppen¹ im Streptomycin und im Streptidin hervorgehoben zu werden. Wir haben schon früher diesen Einfluss in einer Tabelle zum Ausdruck gebracht:

Fällung von 0,1%iger RNS-Lösung durch die angegebenen Konzentrationen

	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Streptomycin	+++	+++	++	+
Dekamethylen-diguanid..	+++	+++	++	+
Dimethylen-diguanid . . .	+	+	(+)	
Trypaflavin	+++	+++	++	+

Die Fähigkeit des Streptomycins Nukleinsäuren zu binden kommt auch zum Ausdruck in der antagonistischen Wirkung, welche in diesem Institut durch Versuch von DICZFALUSY² bezgl. des Zuwachses von *Escherichia Coli* und *Staphylococcus aureus* konstatiert wurde.³

Zu der S. 295 bereits erwähnten Frage der Spezifität des Streptomycins und Streptidins ist noch folgendes zu bemerken: Man findet in der Litteratur bereits Angaben über die Fähigkeit einer Substanzgruppe zur Nukleinsäure-Bindung, nämlich der *Akridine*. WAGNER-JAUREGG⁴ stellte bereits 1940 eine Salzbildung zwischen Akridin und Ribonukleinsäure fest und nahm an, dass diese Salzbildung vom Ringstickstoff vermittelt wird. 1941 beobachtete McILWAIN⁵ dass die Ribonukleinsäure im Stande ist, die zuwachsfördernde Wirkung aufzuheben, welche *Trypaflavin* auf *B. Coli* ausübt. DUSTIN⁶ entdeckte dann die Eigenschaft des Trypaflavins als Mitosengift (im Gegensatz zu Colchicin hemmt Trypaflavin die ersten Mitosenphasen). Diese Mitose-Gift-Wirkung kann nach Beobachtungen von H. LETTRÉ⁷ durch Ribonukleinsäure aufgehoben werden.

Chlorophylldefekte, welche wir durch Streptomycin hervorrufen können, lassen

¹ Es muss hier allerdings hervorgehoben werden, dass Guanidin selbst und einfache Guanidin-Derivate weder Nukleinsäure bzw. Nukleoproteide fällen noch den Antichlorophylldefekt auslösen.

² DICZFALUSY und EULER, Dieses Arkiv 25 A 16, 12 (1947).

³ Siehe hierzu auch PANDALAI u. GEORGE, Current Science 16, 312 (1947).

⁴ Siehe auch WAGNER-JAUREGG, Z. physiol. Chem. 239, 188 (1936).

⁵ McILWAIN, Biochem. J. 35, 34 (1941).

⁶ DUSTIN, Arch. exp. Zellf. 22, 395 (1939).

⁷ H. LETTRÉ, Z. f. Krebsf. 56, 5 (1948).

sich — wenigstens bei gewissen Pflanzen, z. B. *Lepidium sativum* — auch durch Behandlung mit Trypaflavin-Lösungen erzeugen. Die Hemmung durch Ribonukleinsäure ist uns noch nicht gelungen.

Wirkung des Streptomycins auf chlorophylldefekte Gerstenmutanten

Es erschien uns gleich nach der Entdeckung der Anti-Chlorophyll-Wirkung des Streptomycins als eine der wesentlichsten Aufgaben zu untersuchen, wie sich unsere STRM-chlorophylldefekten Gerstenpflanzen zu genetisch definierten chlorophylldefekten Pflanzen verhalten, mit anderen Worten, ob der durch STRM hervorgerufene Chlorophylldefekt durch eine Veränderung im Zellkern, also durch die Zerstörung eines chlorophyll-bedingenden Gens verursacht ist, oder ob der STRM-hervorgerufene Chlorophylldefekt durch Vorgänge im Plasma bedingt ist.

Bis jetzt konnten nur einige orientierende Versuchsreihen durchgeführt werden, und zwar an Samen chlorophylldefekter Gerste vom Albina-Typus. Wir sind der Pflanzenzuchtanstalt SVALÖF und Herrn Prof. Dr. ÅKE GUSTAFSSON für die freundliche Überlassung eines Materiales Albina 1 (1946) sehr zu Dank verpflichtet.

Es war unser Ziel an den Heterozygoten dieser Ernte die Empfindlichkeit gegen einen STRM-Gehalt der Keimungslösung festzustellen und mit derjenigen einer normalen Gersten-Sorte zu vergleichen.

Leider erwies sich die Keimfähigkeit der erhaltenen Samen ziemlich gering, so dass ein Material von statistisch verwertbarem Umfang noch nicht vorliegt.

Es kamen 138 Gerstenkörner vom Albina 1-Typus zur Untersuchung, von welchen nur 33 keimten. Unser gesamtes Albina-Material wurde nun in zwei Teile geteilt, nämlich 11 unbehandelte, in Wasser gekeimte Samen und 22 in einer 0,05-%igen STRM-Lösung gekeimte Samen.

Zum Vergleich verwendeten wir wie bei früheren Versuchen¹ die Siegergerste von SVALÖF, und zwar 3 Gruppen von je 33 Körnern.

Das Ergebnis war folgendes:

	Albina-Gruppe I unbehandelt 11 Pflanzen	Albina-Gruppe II STRM-behand. 22 Pflanzen
Grün	10	13
Weiss	1	9

	Siegergerste Gruppe I, 33 Pflanzen, 2 ungekeimt	Gruppe II, 0,05 % STRM, 33 Pflanzen, 3 ungekeimt	Gruppe III, 0,1 % STRM, 33 Pflanzen, 4 ungekeimt
Grün	31	29	6
Weiss	0	1	23

¹ EULER, Dieses Arkiv 26 A Nr 30 (1948/49).

Wirkungen der heterologen und homologen Normalseren auf fixierte Rattenleberzellen

VON HANS VON EULER, LEO HELLER und CHRISTINE CURMAN

Im Verlauf unserer Studien über die karzinolytische Reaktion von FREUND u. KAMINER (1) ist ein Problem von wohl viel grösserer Bedeutung und Tragweite hervorgetreten — das Problem der Heterologie, der Einwirkung artfremden Serums auf Zellen einer beliebigen Tierart. Das Studium der einschlägigen Literatur führte zu dem sicher unerwarteten Ergebnis, dass die ausserordentlich grosse Anzahl der serologischen Arbeiten, die sich mit dem Problem der Heterologie befassten, fast ausnahmslos dem Studium der Wirkungen verschiedener, sowohl immuner wie normaler Seren auf die heterologen Blutkörperchen oder Eiweissfraktionen des Blutes gewidmet war (2), während die ev. Wirkungen der heterologen Seren auf verschiedene Organzellen praktisch so gut wie vollständig unberücksichtigt blieben. Unsere Kenntniss der Einwirkung verschiedener Serumarten auf homologe und heterologe Zellen ist somit immer noch auf die Ergebnisse der Untersuchungen über die Iso-resp. Heterohämagglutinine begrenzt, ohne Rücksicht auf die weitgehende Spezialisierung und Differenzierung der Erythrozyten: die mit diesen im Absterben begriffenen Zellen gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nicht ohne weiteres auf die Wechselwirkungen zwischen Serum und verschiedenen Organzellen ausdehnen.

Diese auffallende Vernachlässigung eines, unserer Ansicht nach sehr wichtigen Gebietes findet wohl ihre Erklärung in den rein technischen Schwierigkeiten die einzelnen Zellen irgend eines Organes aus ihrem Zellverband auszulösen und sie dadurch den Einwirkungen der zu prüfenden Seren leichter zugänglich zu machen.

Ausser den zahlreichen Arbeiten der FREUND'schen Schule (einschlägige Literatur 3 a u. 3 b), welche die nach FREUND (4) bereiteten Aufschwemmungen der menschlichen Lebermetastasenzellen in schwach saurem Medium als Substrat für die homologen (normalen) und angeblich heterologen (Carcinom-) Seren verwenden, findet man, wenigstens in der uns zugänglichen Literatur, keine Angaben, die sich mit dem Verhalten von Organzellen bei Bebrütung mit dem Blutserum befassen. Suspensionen der Organzellen sind allerdings von einigen Autoren mehrmals benutzt worden, aber immer in ganz anderen Zusammenhängen (5).

Die Technik der Gewebezüchtung gibt uns aber die Möglichkeit, gewisse Schlüsse auf die Einwirkung oder Nichteinwirkung des Serums auf wachsende Zellen zu ziehen, da die dabei verwendeten Medien zum Teil aus Blutserum bestehen. In diesem Zusammenhange kann die Beobachtung von STERN u. WILLHEIM (6) angeführt werden, die einen (im Vergleich mit dem Normalserum)

fördernden Einfluss der Karzinomseren auf das Wachstum der Gewebeskulturen beobachtet haben.

Dieses Gedeihen von Gewebeskulturen in serumhaltigen Medien (bei gleichzeitiger Gegenwart von Embryonalextrakt) könnte vielleicht im Sinne des Nichtbestehens eines etwaigen Enzym-Substrat-Verhältnisses zwischen Serum und lebenden Organzellen gedeutet werden, und zwar sowohl für die homologen wie auch für die heterologen (nicht immunen!) Seren. Es unterliegt jedoch keinem Zweifel, dass im Serum eine ganze Reihe von Enzymen vorhanden ist, die meisten von ihnen in aktiver Form, welche die verschiedenen, in der Zelle vorzufindenden Substrate zu zerlegen vermögen. Wenn derartige enzymatische Spaltungen in den Gewebeskulturen nicht beobachtet werden, so kann dieser Umstand wohl am leichtesten durch die Existenz einer für die Serumenzyme undurchlässigen Zellmembran erklärt werden, die zwar gewisse hochmolekulare Stoffe durchlässt (7), aber für andere ganz undurchlässig sein kann.

Wegen dieser eventuellen Undurchlässigkeit der Zellmembran wie auch wegen der oben erwähnten Schwierigkeit der Erzeugung guter Aufschwemmungen von Organzellen (vgl. (3)) haben wir unsere Studien über die Wirkungen heterologer und homologer Blutseren auf die Leberzellen mittels ungefähr derselben Methodik eingeleitet, die wir in unserer letzten Mitteilung über die karzino-lytische Reaktion (8) beschrieben haben, das heisst mit der Feststellung eventueller Färbbarkeitsänderungen der fixierten Zellen nach der Bebrütung der Präparate mit dem auf seine Wirkung auf die Zellen zu untersuchenden Serum. Die vorliegende Mitteilung berichtet über das Ergebnis der ersten Serie dieser Versuche, die sich mit der Einwirkung heterologer und homologer Seren auf die Methanol-fixierten Leberzellen in Ausstrichpräparaten der Rattenleber befassen. Diese Technik besitzt den Vorteil einer gewissen Blosslegung des Zellinhaltes als Folge der weitgehenden Verflachung der Zellen beim Ausstreichen; diese Verflachung dürfte die Einwirkung der im Serum ev. vorhandenen Enzyme recht wesentlich erleichtern.

Zur Methodik:

a) *Zellsubstrat*: Frisch entnommene Rattenleber wurde 3–4 Stunden im Ranvier'schen »Drittellalkohol« (11) (30 %-iges Äthanol) in der Form von kleinen 2–3 mm dicken Stückchen (die geringe Schichtdicke der Stückchen erleichtert das Eindringen des Alkohols), etwa 3–4 Stunden lang mazeriert und zur Verfertigung einer Serie von je 15–20 Ausstrichpräparaten verwendet. Die Dauer der Mazeration wurde so gewählt, dass das Lebergewebe weder zu hart noch zu weich und brüchig wurde und sich gut ausstreichen liess. Das Ausstreichen unmacerierten Lebergewebes lieferte Präparate, die fast ausschliesslich aus nackten Leberzellkernen bestanden, da die meisten Leberzellen während des Ausstreichens des unbehandelten Gewebes zerstört werden und keine scharfe Begrenzung ihres Zytoplasmas aufweisen.

Die lufttrockenen Ausstriche wurden mit Methanol fixiert (Dauer 3 Min.), dann mit destilliertem Wasser abgespült und wieder getrocknet.

b) *Serum*: Es wurden insgesamt 10 homologe, (d. h. Ratten-)Seren und 10 heterologe (menschliche) Seren geprüft. Ein Rattenserum stammte von einer Benzpyrensarkomratte (transplantierte Tumor), alle anderen von anscheinend gesunden Tieren (Alter 5–6 Monate). Die 10 geprüften menschlichen Seren

stammten von 6 anscheinend gesunden Personen verschiedenen Geschlechts (ein Serum wurde 4-mal, ein anderes 2-mal entnommen) und wurden meistens mehrmals geprüft, wobei sie einmal ganz frisch und dann wiederholt im CO_2 -schnee gefroren aufbewahrt verwendet wurden. Es konnten dabei keine Unterschiede zwischen der Wirkung des frischen und des gefrorenen (unmittelbar vor dem Versuche aufgetauten) Serums gefunden werden.

c) *Versuchsanordnung*: Die entsprechend nummerierten Ausstrichpräparate wurden in ihrer Mitte mit einem Tropfen des zu untersuchenden Serums versetzt. Die Bebrütung erfolgte in (mittels Vaseline) luftdicht abgeschlossenen Petrischalen, die ausser den Präparaten noch einen mit Chloroform durchtränkten Wattebausch enthielten. Dieser befand sich in einem kleinen Präparatgläschen. Die Ausstriche mit dem auf ihnen aufgeschichteten Serumtropfen befanden sich somit in einer mit Chloroform gesättigten Atmosphäre, um ein eventuelles Bakterienwachstum zu hemmen.

Auf dem Boden der Petrischalen befand sich eine oder mehrere Schichten mit Wasser befeuchteten Filterpapiers. Diese Anordnung sollte den Luftraum innerhalb der Schalen auch mit Wasserdampf gesättigt machen und auf diese Weise dem Eintrocknen des Serums entgegenwirken. Die Ausstriche selbst wurden auf parallel liegende Glasstäbchen gelegt. Trotz des möglichst vorsichtigen Auflegens der Präparate mit dem auf ihnen aufgeschichteten Serumtropfen ohne direkte Berührung mit dem feuchten Filterpapier unter ihnen, zerrann das Serum recht oft, sobald die Bebrütungstemperatur von 37°C durch das Einstellen der Schalen in den Luftschrank von dieser Temperatur erreicht wurde. Beim Herausnehmen der Präparate wurden aber jedesmal die Grenzen des zerronnenen Serumtropfens für jedes Ausstrichpräparat auf einem Blatt Schreibpapier aufgezeichnet. Auf diese Weise wusste man immer, welche Teile der gesamten Oberfläche der Ausstriche der Einwirkung des Serums ausgesetzt worden sind, und man konnte ihr mikroskopisches Aussehen nach der Färbung mit demjenigen der mit Serum unbedeckt gebliebenen Kontrollteile des Präparates vergleichen. Bei der endgültigen Beurteilung der Ergebnisse wurden nur diejenigen Ausstriche berücksichtigt, deren unbehandelte Kontrollteile einwandfrei gefärbt erschienen und das für die Leberzellen typische Aussehen (9) zeigten.

Die Sättigung des Luftraumes über den Präparaten mit Chloroformdampf hatte keinen nachteiligen Effekt auf die Färbbarkeit der Ausstriche. Auf die meisten Fermentsysteme verschiedener Fermentgemische übt, wie bekannt (vgl. z. B. 10), das Chloroform keinen stärkeren Effekt aus. Bei einigen Versuchen, wo die Bebrütungszeit bei 37°C auf nur 4 Stunden begrenzt war und somit die Wahrscheinlichkeit eines stärkeren Bakterienwachstums gering erschien, wurde auf das Verwenden von Chloroform verzichtet und für die Sterilität der Ansätze durch möglichst aseptisches Arbeiten (Sterilentnehmen des Serums, Sterilisieren des zu verwendeten Glases usw.) gesorgt. Die Ergebnisse blieben in diesen Fällen dieselben wie beim Arbeiten in Chloroformatmosphäre.

Als Kontrolle diente ein mit einem Tropfen Ringerlösung anstatt Serum bebrütetes und auch im übrigen auf genau dieselbe Art behandeltes Präparat.

Es wurden immer mit jedem Serum (resp. Ringerlösung) je zwei Präparate bebrütet, da die Färbung mittels zwei verschiedener Färbungsmethoden geschah (siehe unten).

Die Bebrütungszeit (mit den oben erwähnten Ausnahmen) betrug im allgemeinen etwa $16\frac{1}{2}$ Stunden.

d) *Färbung*: Das während der Bebrütung meistens etwas eingedickte Serum wurde mit destilliertem Wasser von der Oberfläche des Ausstriches sorgfältig abgewaschen und die Präparate teils nach FEULGEN, teils mittels der für Blutausstriche üblichen panoptischen Methode von PAPPENHEIM (mit Giemsa u. May-Grünwald) gefärbt (Technik der Färbung nach ROMEIS (11)). Die bei der Feulgenschen Nuklealfärbung störenden Plasmalogene wurden durch das 24-stündige Stehenlassen der Ausstriche in 96 %-igem Äthylalkohol vor der Säurehydrolyse entfernt. Nachgefärbt wurde mit einer 1 %-igen Lösung von Lichtgrün, um die cytoplasmatischen Strukturen der nach FEULGEN gefärbten Präparate sichtbar zu machen und einen besseren Kontrast mit den spezifisch gefärbten Zellkernen zu schaffen (für die Beurteilung des Aussehens des Leberzellocytoplasmas hatten natürlich die durch die Säurebehandlung entstellten cytoplasmatischen Strukturen der FEULGEN-Präparate keine Bedeutung — hier war nur das Verhalten der panoptisch gefärbten Präparate massgebend).

Die Präparate wurden unter Ölimmersion untersucht und das Aussehen der mit Serum resp. Ringerlösung behandelten zentralen Teile der Ausstriche miteinander und mit dem Aussehen der unbehandelt gebliebenen Kontrollpartien derselben Präparate verglichen.

Ergebnisse

1. Aussehen der unbehandelten Kontrollpartien der Leberausstriche

Die unbehandelten seitlichen Kontrollpartien der Leberausstriche hatten das von den einschlägigen Lehrbüchern der Histologie (12) wohlbekannte typische Aussehen der unversehrt gebliebenen Leberzellen. Das Cytoplasma erschien scharf abgegrenzt (auf den panoptisch gefärbten Präparaten), und zeigte die Gegenwart zahlreicher blauer Körner und Schollen verschiedener Grösse und unregelmässiger Form (Glykogen), die in einer grau-rötlich-violett gefärbten Grundsubstanz eingebettet waren. Die Grundsubstanz selbst erschien nicht ganz homogen sondern fein granuliert oder schaumförmig.

Die Zellkerne waren blau-violett (bei FEULGEN-Färbung rot) und zeigten eine deutliche Strukturierung (vgl. 12) wie auch die Gegenwart mehrerer (2–3) stärker blau gefärbter Nukleolen, die auf den FEULGEN-gefärbten Ausstrichen als leer erschienen. Die balkenförmige Strukturierung der Zellkerne trat auf den nuklealgefärbten Präparaten sehr deutlich hervor.

2. Aussehen der mit Ringerlösung behandelten Kontrollen

a) *Das Cytoplasma*: Das Bebrüten der methanolfixierten Leberausstriche mit einem Tropfen Ringerlösung hatte im allgemeinen ein teilweises Zerfliessen des nach PAPPENHEIM (panoptisch) färbaren Cytoplasmas der Leberzellen mit dem dadurch verursachten Verwischen der Zellgrenzen zur Folge. Die blauen Glykogen-Körner und Schollen verschwanden und die zurückgebliebenen ungeformten, nunmehr ganz homogen erscheinenden Massen zytoplasmatischen Ursprungs hatten eine ausgesprochen acidophile Rosafärbung angenommen.

b) *Die Zellkerne*: Die Zellkerne erschienen in den weitaus meisten Fällen ganz scharf abgegrenzt und stark gefärbt, aber ihre innere Struktur zeigte je

nach der verwendeten Färbungsmethode ein unterschiedliches Verhalten. Während die balkenförmige Strukturierung der unbehandelten Kontrollteile bei der Nuklealfärbung fast unverändert erhalten erschien, zeigten die nunmehr stark rötlich violett gefärbten Kerne der panoptischen Serie nach der Behandlung mit Ringerlösung ein völliges Verwaschen ihrer früher so deutlicher Struktur und erschienen ganz homogen gefärbt. Auch die Nukleolen waren spurlos verschwunden.

3. Aussehen der mit heterologem (menschlichem) Serum behandelten Präparate

In diesem Falle wurden ausnahmslos dieselben Veränderungen sowohl im Aussehen des Zellzytoplasmas wie in dem der Zellkerne gefunden wie im Falle der Ringerlösung. Die Stärke der Kernfärbung war auch hier sowohl bei der FEULGEN- wie bei der MAY-GRÜNWARD u. GIEMSA-Färbung gut, aber die Struktureinheiten waren nur bei der FEULGEN-Färbung zu unterscheiden. Auf manchen panoptisch gefärbten Präparaten dieser Gruppe (wie auch auf manchen Ringerkontrollen) zeigten aber die Zellkerne ein Verwaschen ihrer meistens so scharfen Konturen mit der Bildung einer Art von rötlich violetter strahlartigem Halo um den homogen und stärker gefärbten Kern. Dieses Aussehen zeigten meistens die freiliegenden Kerne der bei dem Ausstreichen teilweise zerstörten Zellen, aber es konnte auch für einzelne anscheinend beim Ausstreichen gut erhaltene Zellen beobachtet werden. Dieses Bild, das wohl im Sinne einer beginnenden Auslösung eines färbbaren Materials aus den Zellkernen gedeutet werden darf, wurde aber nur in einzelnen Fällen und nur für einen Teil der Kerne beobachtet. Die nach FEULGEN gefärbten Parallelpräparate zeigten, wie schon gesagt, immer eine ganz scharfe Konturierung und Struktur. Das sich lösende Material war somit allem Anschein nach nicht mit der FEULGEN-positiven Kernsubstanz (Desoxyribonukleinsäure) identisch.

4. Verhalten der mit homologem (Ratten-)Serum behandelten Präparate

Das Verhalten der von uns geprüften Rattenserum war nicht so einheitlich wie dasjenige der Menschenserum. Von insgesamt 10 geprüften Rattenserum zeigten 4 das gleiche Verhalten wie die menschlichen Seren, d. h. die Abwesenheit deutlicher Unterschiede gegenüber der sicher unspezifischen und unenzymatischen Einwirkung der Ringerlösung auf die fixierten Rattenleberzellen. Vier andere Rattenserum zeigten dagegen einen weitgehenden Verlust der Färbbarkeit bei der panoptischen und einen totalen bei der FEULGEN-Färbung. Die restlichen zwei Seren zeigten ein dazwischenliegendes Verhalten. Das Aussehen des Zellcytoplasmas zeigte keine Besonderheiten gegenüber dem schon beschriebenen.

Das Verschwinden der Färbbarkeit nach FEULGEN, das nach der Einwirkung eines Teiles der Rattenserum beobachtet wurde (zwischen den dazugehörigen Seren befand sich auch das einzige zurzeit in diesem Zusammenhange untersuchte Sarkomserum — siehe oben u. Methodik) bildete eine Analogie zum Verhalten der heterologen u. homologen fixierten Tumorzellen den normalen und sarkomatösen, Rattenserum gegenüber, wie es in unserer schon erwähnten Mitteilung (8) beschrieben worden ist.

Auch im Falle der Leber wurde bei der panoptischen Färbung eine Auflockerung der Kerne gefunden, von denen nur ein verhältnismässig grobballiges Gerüst rötlichviolett gefärbt war. In manchen Zellen war auch dieses Gerüst ziemlich schwach gefärbt, während die nuklealgefärbten u. mit Lichtgrün nachgefärbten Präparate nur die Anwesenheit unförmlicher, grün gefärbter Massen aufwiesen.

Das verwendete Rattenmaterial war ziemlich einheitlich, da wir nur Männchen ungefähr desselben Alters (6–7 Monate alt) verwendeten, und die beobachteten Unterschiede konnten somit nicht auf Geschlechts- oder Altersunterschieden beruhen. Auch der Umstand, ob das Serum eigen oder fremd war (d. h. ob es von derselben Ratte stammte, welche die Leber für die Ausstriche geliefert hatte oder von einer anderen) schien in diesem Zusammenhang ohne Einfluss.

Da die Mehrzahl unserer Rattenseren trotz grösster Vorsicht bei der Blutentnahme ein wenig hämolysiert war, haben wir auch die Möglichkeit geprüft, dass die beobachteten Wirkungen auf die Zellkerne nicht durch das Serum selbst, sondern durch bei der Hämolysen aus den roten Blutkörperchen ins Serum ausgetretene Bestandteile der Erythrozyten verursacht waren. Die Bebrütung der Ausstriche mit hämolysierten menschlichen Seren (durch Ausschütteln des Blutes mit Äther erzeugt) wie auch mit einer Suspension der menschlichen roten Blutkörperchen ergab aber dieselben Bilder wie mit dem unhämolysierten Serum, was gegen den erythrozytären Ursprung der kariolytisch wirkenden Stoffe in manchen Rattenseren spricht. Auch zwischen dem durch grobe Schätzung bestimmbaren Grad der Hämolysen der respektiven Rattenseren und ihrer kariolytischen Wirkung bestand augenscheinlich keine Korrelation.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Bebrütung der fixierten Ausstrichpräparate der Rattenleber mit normalen Menschenseren scheint keine solchen chemischen Veränderungen von deutlich spezifischer Natur in den Zellen der Präparate hervorzurufen, die von denen durch Ringerlösung verursachten verschieden wären. Dabei wird das Aussehen der gleichartig behandelten und gefärbten Präparate dem Vergleich zugrunde gelegt. Mittels einer derartigen Methodik konnten somit keine spezifischen Wirkungen eines heterologen Serums auf artfremde Organzellen nachgewiesen werden.

2. Das Serum normaler oder sarkomatöser Ratten scheint in manchen Fällen eine ziemlich spezifische Wirkung auf die Zellkerne der fixierten (homologen) Rattenleberzellen auszuüben, die sich vor allem im Verschwinden der für die Desoxyribonukleinsäuren spezifischen Färbbarkeit nach FEULGEN zu äussern pflegt.

Weitere Versuche über die Wirkung der spezifischen Immunsereen auf die fixierten Leberzellen sind im Gang. Die dabei gewonnenen Resultate und die hier mitgeteilten Ergebnisse werden in unserer nächsten Arbeit ausführlich diskutiert werden.

Stockholm, Universität, Institut für organ.-chem. Forschung.

- LITERATURVERZEICHNIS. 1. **H. v. Euler, Leo Heller u. Chr. Curman:** Sv. Vetensk.-Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. I, Nr. 8 (1948). — 2. Vgl. z. B. **R. Doerr:** Die Immunitätsfsg., Bd. IV, T. 2 (Wien 1949). — 3 a. **H. v. Euler u. B. Skarzynski:** Biochemie der Tumoren (Stuttgart, Enke, 1942). — 3 b. **K. Stern u. R. Willheim:** The Biochemistry of Malignant Tumors (New-York 1943). — 4. **E. Freund** in Barrenscheen-Wilheim: Die Laboratoriumsmethoden der Wiener Kliniken (Wien 1928). — 5. z. B. **R. Bieling u. L. Oelrichs** — zusammengefasst in: Bieling u. Heinlein, Fiat Reviews of German Science, deutsche Ausgabe, Bd. 65 (1947). — 6. **K. Stern u. R. Willheim:** Biochemistry of Malignant Tumors, Reference Press, 1943. — 7. **J. F. Danielli:** J. Physiol. 98, 1 P. (1940); Cytology a. Cell Physiology (Ed. by Geoffrey Bourne, Oxford 1942, repr. 1945) p. 82; H. Davson a. J. F. Danielli: The Permeability of Natural Membranes (Cambridge 1941). — 8. **H. v. Euler, L. Heller u. C. Curman:** Sv. Vetensk.-Akad. Arkiv f. Kemi: in Vorbereitung (1949). — 9. z. B. **J. Szymonowicz:** Lehrbuch der Histologie, 5. Aufl., Leipzig 1924, S. 372. — 10. **M. Steiner** in Bamann-Myrbäck: Die Methoden der Fermentfsg., Bd. 1, S. 830 (1941). — 11. **B. Romeis:** Taschenbuch der mikroskopischen Technik (12. Aufl., 1928).

Tryckt den 4 augusti 1949



Über oxydative Spaltung der Stearinsäure in 2-basische Säuren und über Derivate derselben

H. v. EULER, HANS HASSELQUIST und UNO LÖÖV

Wie in einer vorhergehenden Mitteilung über Paraffin-Oxydation¹ bereits hervorgehoben wurde, führt Salpetersäure als Oxydationsmittel zur Bildung 2-basischer Säuren, während durch die oxydative Einwirkung von Sauerstoff mit und ohne Katalysatoren überwiegend einbasische Oxysäuren entstehen. Mit Stearinsäure als Modells substanz haben wir die Bildung 2-basischer Säuren durch Salpetersäure, studiert und zwar unter Zusatz von Schwefelsäure. Es hat sich nämlich gezeigt, dass der Zusatz von konz. Schwefelsäure die Wirkung der konz. Salpetersäure beschleunigt, wie dies auch bei der Nitrierung von Benzol und Benzolderivaten der Fall ist. Wie der eine von uns (H. v. E.) vor langer Zeit hervorgehoben hat², ist das Ion NO_2^+ bei der Nitrierung die reaktionsvermittelnde Molekülart der konz. Salpetersäure und diese Molekülart wird durch die konz. Schwefelsäure wesentlich vermehrt.

Bei der Oxydation der Fettsäuren scheint das Ion NO_2^+ gleichzeitig mit dem komplexen Ion $(\text{NO}_2 \cdot \text{O}_2)^+$ als reaktionsvermittelnde Molekülart zu fungieren. In Gegenwart von konz. Schwefelsäure steht NO_2^+ mit Nitrosylschwefelsäure im Gleichgewicht. Auf der Kinetik der Salpetersäure-Oxydation der Fettsäuren und anderer Substrate und der ev. als Zwischenprodukt auftretenden Nitrofettsäuren hoffen wir bald ausführlicher zurückzukommen.³

Spaltprodukte der Stearinsäure

Die oxydative Spaltung der Stearinsäure durch Salpetersäure wurde in folgender Weise durchgeführt.

240 g Stearinsäure	Reaktionszeit
180 ml 70 %-ige Schwefelsäure	69 Stunden
1,2 l rauchende Salpetersäure sp. Gew. 1,52	

¹ EULER und H. HASSELQUIST, Dieses Archiv 26 A No 23 (1948).

² EULER, Lieb. Ann. 330, 280 u.zw. 286 (1903). — Homogene Katalyse. Berlin, Sammlung Götschen 1922. Die dort erstmalig gemachte Annahme wurde später von C. K. INGOLD eingehend begründet. (C. K. INGOLD et al. Nature 158, 448, 512 (1946). — 163, 599 (1949). — BENETT et al. J. Chem. Soc. 1946, 869. — LARS MELANDER, Nature 163, 599 (1949).

³ Bei der Einwirkung der konz. Salpetersäure auf höhere Fettsäuren entsteht u. a. ein bisher noch nicht rein dargestelltes öliges Nitro-Derivat, welches bereits A. E. ARPPE (Z. f. Chemie 2. F. 8, 295 (1865) in den Händen hatte (siehe auch Ann. Chem. Pharm. 116 143—120, 288) und welches von A. CLAUS u. O. PFEIFFER (J. prakt. Chem. N. F. 43 161; 1891) als Isonitroso-Stearinsäure angesprochen wurde.

Die Reaktionsmischung wurde auf das halbe Volumen eingeeengt, wobei sich 2 Schichten bildeten.

Untere Schicht

Auf ein geringes Volumen eingedunstet, wobei fast die gesamte Salpetersäure übergeht. Der Rest der Lösung wird mit Petroleumäther ausgeschüttelt um die Monocarbonsäuren zu entfernen.

Die übrigbleibende Lösung B wird unter kräftigem Umrühren mit Eiswasser versetzt und kalt filtriert.

Fällung B_A

26 g

Korksäure²,
Azelainsäure

Filtrat B_B

10 g

Obere Schicht

Nach Abkühlung einer Krystallmasse, die mit Petroleumäther ausgeschüttelt wird um die Monocarbonsäuren zu entfernen.

Die übrig bleibende Lösung D wird unter starkem Umrühren mit 1 L Eiswasser versetzt und kalt filtriert.

Fällung (klebrig)

Wird zweimal mit zusammen 2 Liter Wasser ausgekocht und warm filtriert.

Ungelöst E
Brassylsäure
39 g

Wässrige Lös. F
Die beim Abkühlen entstehende Fällung abfiltriert.

Klebrige Fällung G Filtr. H
2 g 13 g
Sebacinsäure

Fraktionierung der ungelösten Substanz E

39 g der Subst. E, die in Äther und Benzol leichtlöslich, in Wasser unlöslich ist, wurden mit 1 Liter Extraktionsbenzin, Sp. 60–90° aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden die 3 g ungelöster Krystallmasse, Schmp 89–94°, zweimal aus Chloroform umkrystallisiert, wodurch der Schmp auf 105–108° stieg. Die Krystalle wurden nun 3 mal mit kaltem Äther (je 20 ml) extrahiert; die ungelösten Krystalle bestanden aus farblosen Prismen, Schmp 108,5–109°. Sie waren N-frei. In kochendem Wasser sind sie beinahe unlöslich, dagegen lösen sie sich in siedendem Chloroform, ferner in Äther und leicht in Alkohol.

37,3 mg Subst. wurden in Alkohol gelöst und mit 0,1 n NaOH und Phenolphthalein titriert. Verbrauch 3,025 ml. Daraus ergibt sich als

$$\text{Äquivalentgewicht} \frac{37,3}{0,1 \cdot 3,025} = 123; \quad M = 246.$$

17,4 mg Subst., in Alkohol gelöst, verbrauchten bei der Titration mit 0,1 n. NaOH 1,43 ml. Hieraus berechnet sich das

$$\text{Äquivalentgewicht} \frac{17,4}{0,1 \cdot 1,43} = 121,5; \quad M = 243.$$

Das Produkt E ist als Brassylsäure (Undecandicarbonsäure) (Mol. Gew. 244) anzusprechen. Als Schmp für Brassylsäure wird angegeben 112°; gefunden wurde 108,5 und 109°.

¹ Sämtliche Gewichtsangaben beziehen sich auf die einmal umkrystallisierten Substanzen.

² Die gesperrt gedruckten Substanzen sind aus den betr. Fraktionen isoliert worden.

Über die Trennung der Korksäure und der Azelainsäure siehe F. GANTTER u. C. HELL (Chem. Ber. 14, 1545 (1881)).

Fraktionierung der Fällung G

Die Fällung G, welche grössere Mengen von Wasser enthielt, wurde in Chloroform gelöst; das Wasser wurde im Scheidetrichter abgeschieden, die Chloroformlösung mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und auf ein geringes Volumen eingedampft.

Der Rückstand bestand aus 2 g kugelförmiger Krystalle vom Schmp 112—116°. Nach 3 weiteren Umkrystallisationen aus Chloroform schmolz die Subst. bei 129—130°. Kleine, farblose Blättchen, die keinen Stickstoff enthalten.

17,3 mg Subst. mit 0,1 n NaOH in alkoholischer Lösung titriert verbrauchten 1,745 ml Natronlauge. Daraus erhält man das

$$\text{Äquivalentgewicht} \frac{17,3}{0,1 \cdot 1,745} = 99; \quad M = 198.$$

Das Produkt G erwies sich somit als *Sebacinsäure* (Mol. Gew. ber. 202). Ein Mischschmelzpunkt mit reiner Sebacinsäure, Schmp 131—132°, ergab keine Depression.

Ringbildungen mit Sebacinsäure und mit Korksäure

Die Probleme der Ringbildung organischer Substanzen sind bekanntlich von A. v. BAEYER bereits 1885 eingehend diskutiert worden.¹ Schon 4 Jahre vorher hat A. MICHAEL², ebenfalls unter Hinweis auf die theoretische Bedeutung der Ringbildung für die Aufklärung prinzipieller struktureller Fragen, die Erscheinung des Ringschlusses zum Gegenstand theoretischer Betrachtungen gemacht. Er kam später wieder darauf zurück³: »Ist das Ringschliessen eine Frage der räumlichen Entfernung der daran beteiligten Atome oder Gruppen, so muss dasselbe eine mit Zunahme der Kettenlänge wiederkehrende Erscheinung sein. Durch die Versuche von v. BAEYER und JACKSON über die Nichtbildung eines siebengliedrigen Homologen des Carbostyryls, sowie durch andere Reaktionen, ist der Beweis gegeben, dass die Endgruppen in diesen Verbindungen weiter von einander entfernt sein müssen, als die der entsprechenden Derivate mit 5- und 6-gliedrigen Gruppen.«

Messungen des Dipolmomentes, Ultracentrifugierung, Elektrophorese, Oberflächenspannung haben bezüglich der Gestalt gewisser Ketten Anhaltspunkte geliefert. Über die Ringbildung von Derivaten der höheren zweibasischen Fettsäuren von 6 und mehr C-Atomen liegen noch keine aufschlussgebenden Angaben vor. Werden die beiden Carboxylgruppen durch Vermittlung eines O- oder N-Atoms oder durch Vermittlung von Diaminen verbunden so erhält man Produkte, welche sich am einfachsten als Ringe formulieren lassen, über derer Gestaltung aber noch nichts bekannt ist. MICHAEL hat sich (l. c.) besonders an die Leichtigkeit der Ringschliessung gehalten und meint, dass die Erscheinung des Ringschliessens eine periodische Funktion der Kettenlänge sei. Nimmt man hierbei als massgebende Faktoren einerseits die Spannung, die bei

¹ A. v. BAEYER, Chem. Ber. 18, 674 (1885).

² A. MICHAEL, Chem. Ber. 14, 2105 (1881).

³ A. MICHAEL, J. prakt. Chem. N. F. 49, 26 (1894).

der Ringbildung zu überwinden ist, andererseits den wahrscheinlichen Abstand der beiden Carboxylgruppen an, so dürfte — wie man sich auch die Form eines etwa 10—12 gliedrigen Ringes denkt — ein Optimum der Ringschliessung erreicht werden. Ob in längeren Molekülen gewisse Spiralfornen bezw. Stabformen Gleichgewichtslagen darstellen, die in einem Mesomerie-Verhältnis stehen, ist noch unbekannt. Nach dem, was man bis jetzt über die Atomabstände in geradzahlgigen und ungeradzahlgigen Fettsäure-Molekülen weiss, wird man annehmen müssen, dass die Atomzahl auch bezüglich der Ringformen eine Rolle spielt.

Kondensation der Sebacinsäure mit Äthylendiamin

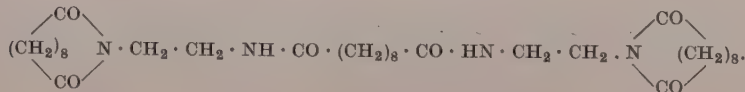
1 g Sebacinsäure mit 2 g PCl_5 in wenig Benzol aufgeschlämmt, wird auf dem Wasserbad erhitzt bis keine Salzsäure mehr entweicht. Das POCl_3 wird im Vacuum abdestilliert. Auf Zusatz von Benzol und 400 mg Äthylendiaminhydrat entstand sofort eine Fällung. Nach 12 Stunden wurde die ausgefallene Substanz abfiltriert und mit Benzol gewaschen. Ausbeute an (chlorhaltiger) Substanz 500 mg.

Da vermutet wurde, dass ein salzsaures Salz vorlag, wurde der Niederschlag in warmem Alkohol unter Zusatz von 2-n. NaOH auf dem Wasserbad erwärmt. Es ging aber nur ein kleiner Anteil in Lösung. Nach Zusatz von Eisessig bis zur schwach sauren Reaktion wurde die Fällung abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Schmp. 248—256°. Das erhaltene chlorfreie Produkt wurde aus Eisessig umkrystallisiert. Die schwach gelblich gefärbte Substanz schmolz nun bei 258,5—262°. Zur weiteren Reinigung wurde die in heissem Eisessig aufgenommene Substanz mit Adsorptionskohle erwärmt. Aus dem warmen Filtrat fielen kleine weisse Krystalle aus; dieselben schmolzen unter starker Zersetzung und Braunfärbung bei 258—259°.

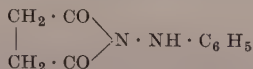
Die in Wasser, Alkohol, Benzol, Äther und Chloroform unlösliche Substanz lieferte die folgenden Analysenwerte:

Berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{N}_4$	N = 9,05 %.
Gefunden:	9,86 %.

Wir schreiben der Substanz folgende Struktur zu:



Es gibt bereits zahlreiche Beispiele für die Bildung substituierter Säureamide 2-basischer Säuren, von denen hier nur das von A. MICHAELIS und R. HERMENS¹ dargestellte Succinylmonohydrazid besonders erwähnt sei:



¹ A. MICHAELIS u. R. HERMENS, Chem. Ber. 25, 2747 (1892).

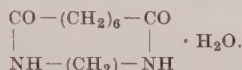
Kondensation der Korksäure mit Äthylendiamin

Die Korksäure wurde nach Zusatz von PCl_3 mit Äthylendiamin in ganz analoger Weise umgesetzt wie die Sebacinsäure (S. 310). Eine kräftige Reaktion trat unter Wärmeentwicklung ein. Das zunächst ausgeschiedene Öl verwandelte sich bald in ein weisses krystallinisches Produkt, das abfiltriert und mit Alkohol gewaschen wurde. Das Rohprodukt schmolz bei $240\text{--}247^\circ$.

Durch 3 Umkrystallisationen aus Eisessig wurde die Substanz analysenrein erhalten; Schmp $272\text{--}273^\circ$. Die kugelförmigen Krystalle sind unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform und Benzol.

<i>Analyse.</i> Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	N = 12,95 %.
Gefunden	13,24 %.

Es hatte sich also 1 Mol Korksäure mit 1 Mol Äthylendiamin kondensiert:



Der 12-gliedrige Ring ist sehr stabil: er wird durch Erwärmen mit 1-n. HCl oder 1 n. NaOH nicht aufgespalten.

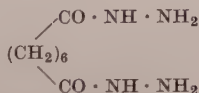
Entsprechend dem sauren Charakter dieses Korksäure-Derivates kann es in eine Dienol-Form übergehen. Weder durch Neutralsalz (NaCl) noch durch Salze 2- oder 3-wertiger Metalle kann dieser Kneuel in Lösung gebracht werden.

Mit der Ringstruktur steht vermutlich in Zusammenhang, dass die Substanz kräftig adsorbiert. Setzt man zu der wässrigen Suspension eine verdünnte Lösung von Kongorot zu, so färbt sich das krystallinische Pulver blaurot und die Farbe kann durch Erwärmen mit Wasser nicht mehr entfernt werden; sie dürfte sterisch festgehalten werden. Ähnlich verhält sich des Adipinsäurederivat.

Mit zweisäurigen Basen können zweibasische Säuren zwei Typen von Verbindungen bilden:

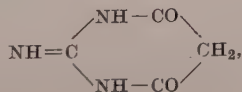
- 1) Die offenen Derivate, bei welchen jedes der beiden Carboxyle selbständig reagiert
- 2) Die ringförmigen Derivate.

Unter den zum Typus 1) gehörigen, bekannten Stoffen seien die von CURTIUS und MITARB., besonders CURTIUS und CLEMM dargestellten Hydrazide erwähnt. Aus Korksäure haben CURTIUS und CLEMM über das Hydrazid das 1,6 Diaminohexan dargestellt.

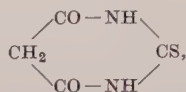


In ähnlicher Weise wurde aus Glutarsäure 1,2 Diaminopropan gewonnen.

Unter den Produkten des Typus 2 mögen die von MICHAEL bereiteten Guanidin-Derivate erwähnt werden:

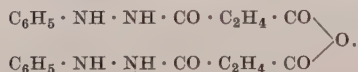


ferner der Malonyl-thioharnstoff (MICHAEL, l. c. S. 38):



der schon in heissem Wasser leicht löslich ist und sich wie eine ziemlich starke Säure verhält. Bei diesen 6-Ringen sind die Besonderheiten, welche bei den Ringen mit 10 und mehr Gliedern auftreten, natürlich nicht zu bemerken.

Zahlreiche Derivate von Anhydriden zweibasischer Säuren sind vor langer Zeit dargestellt worden; sie gehören zum grössten Teil dem offenen Typus 1) an, so z. B. (MICHAELIS u. HERMENS, l. c.).



Das Strukturproblem der grossen Ringe hat uns besonders bezgl. der Nukleoproteide (Gestalt der Chromosomen) interessiert. Wir suchen aber das leitende Princip zunächst bei den Ringen von 12—48 Gliedern.

In Rücksicht auf die Spiralstrukturen, bezw. Bündel-Strukturen, welche bei solchen Stoffen auftreten können, soll besonders die Reaktionsfähigkeit der in gewissen Abständen von den Carboxylgruppen stehenden C-Atome untersucht und bei Säuren von gerader und ungerader C-Atomzahl verglichen werden.

Stockholm, Universität, Institut für organ.-chem. Forschung.

Tryckt den 4 augusti 1949.

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Salting out adsorption of virus

By H. LEYON

Although several methods of concentrating virus from tissue extracts are available they all give only a partial separation of the virus from other substances of high molecular weight. In order to guarantee a tolerable purification of the virus, repeated time consuming procedures are necessary.

In a previous paper by TISELIUS (1) on salting out adsorption the possibilities of this method with respect to the separation of proteins and other substances of high or moderately high molecular weight have been suggested.

In order to investigate the possibility of purifying virus by salting out adsorption, the method was tried on Theiler's virus, strain FA. The experiments reported below show that this virus can be adsorbed by filter paper out of neutral solutions at a concentration of ammonium sulphate too low to precipitate the virus, and further that it can be eluted in distilled water. The results are preliminary, and the experiments are being pursued. The degree of separation of the virus from other substances has not yet been determined.

Theiler's virus, FA, was concentrated from mouse brains and partially purified by ether treatment, precipitation at pH 4.4 in acetate buffer solution, resuspension in neutral phosphate buffer and low and high speed centrifugation according to BOURDILLON (3) with some small modifications.

The concentration of virus was determined by titration in mice. Each sample was diluted in serial tenfold dilutions, each concentration being injected intracerebrally into 5 mice in doses of 0.025 ml. The ID_{50} titer (dose giving 50 per cent infection) was calculated according to REED and MUENCH (5). For a description of the clinical picture see THEILER (7) and THEILER and GARD (8).

BOURDILLON (2) and GARD (4) previously used ammonium sulphate in 0.3 and 1/3 saturation respectively to salt out poliomyelitis and mouse encephalomyelitis viruses. Gard also reports that 0.20 saturation is insufficient to precipitate mouse encephalomyelitis virus.

First an investigation was made of the precipitating power of ammonium sulphate, the pH of the solution also being taken into consideration. In these experiments a crude suspension of virus was used.

The brains were ground in a Waring blender to a 10 per cent suspension in 0.3 per cent sodium chloride. This preparation was centrifuged at 3 000 r. p. m. for 45 minutes and was then treated with 1/5 volume of ether for about 12 hours. This virus suspension, the solution of ammonium sulphate and the water used for diluting were all neutralized to pH 7.2 by means of concentrated ammonium hydroxide.

Three solutions were prepared containing equal amounts of virus, the concentration of salt varying according to table 1. After the preparations had been centri-

fuged at 3 000 r. p. m. for 45 minutes, the precipitates were resuspended in 0.02 molar phosphate buffer to the same volumes as the supernates and both were titrated in mice.

Temp. °C	pH	Concentration of ammonium sulphate		log ID _{50/ml}
20	7.2	0.50 saturation	Supernate	5.5
			Precipitate	6.2
20	7.2	0.35 saturation	Supernate	6.0
			Precipitate	7.2
20	7.2	0.20 saturation	Supernate	7.1
			Precipitate	5.9

0.20 saturation with ammonium sulphate was obviously insufficient but 0.35 saturation sufficient to salt the virus out practically completely.

The salting out adsorption was studied by means of paper strips (Swedish Munktell No. OB), 250 × 25 mm, suspended under a bell jar. On each strip lines were drawn with a soft pencil dividing it into 8 parts, numbered 1–8 from the bottom upwards. The air under the bell jar was saturated with water. The temperature was 20° C.

0.02 ml of partially purified virus suspension, the log ID_{50/ml} of which was determined to 8.7, was placed with a pipette in the middle of part 1 of the paper strip. The lowest edge of the paper was then put into a 0.20 saturated solution of ammonium sulphate of pH 7.2. When the salt solution had reached the upper edge of the paper strip, the paper was cut into 8 equal parts, beginning from the top. The scissors were carefully cleaned before each cutting. Each part of the paper was immediately placed in 2 ml neutral distilled water in a tube. Two experiments were carried out and the parts bearing equal numbers were taken together. The papers in the tubes were minced with glass rods. The tubes were left standing for 2 hours and were then centrifuged at low speed. The clear supernates were diluted 10¹–10⁶ and were then titrated in mice.

No.	log ID _{50/ml}
8	—
7	—
6	—
5	—
4	—
3	3.2
2	5.7
1	6.4

In the parts 4–8 no virus could be demonstrated. Obviously the virus was adsorbed in the lowest part of the paper.

In an experiment with a paper strip of the same length, divided into 4 parts, the following results were obtained with distilled water instead of 0.20 saturated ammonium sulphate.

No.	log ID _{50/ml}
4	7.2
3	7.5
2	5.4
1	5.9

In this experiment which was carried out before the one just reported, the paper strip was 4 cm broad, 0.2 ml virus suspension was used, and 0.05 molar phosphate buffer was used to elute the virus.

The salting out adsorption was then studied on a column of filter paper pulp. In these and the following experiments the same sort of paper was used as in those just reported. The paper was ground in distilled water in a Waring blender and was then dried for some days at 35° C.

To get some idea of the amount of adsorbent needed, 10 ml virus suspension in 0.20 saturated ammonium sulphate, titer 7.7, was treated with different amounts of paper pulp for 30 minutes. 0.5 g paper was enough but 0.1 g not enough to give practically complete adsorption.

1 g filter paper pulp was then packed in a glass burette of 11 mm diameter to a column 6.5 cm high. Distilled water was slowly driven through the column by the aid of compressed air. At the very moment when the upper surface of the column was about to be laid bare, 10 ml of a virus suspension in 0.20 saturated ammonium sulphate, pH 7.2, was added above the column. This virus had been highly purified by ether treatment, precipitation at pH 4.4, low and high speed centrifuging, storing at -16° C for some months, repeated thawing, low and high speed centrifuging. The virus preparation showed only one structure in the electron microscope, spherical particles of about 28 m μ diameter (LEVON and GARD, in course of publication). — Such a highly purified suspension was used with the intention of studying the elution in the electron microscope. This turned out to be possible by means of a method, which will be described in another report. The filtrate, 10 ml, was titrated in mice. Directly following the virus suspension 30 ml distilled water, pH 7.2, was pressed through the column. Of this eluate each milliliter was taken up separately. When samples were alkalisied by means of ammonium hydroxide the first 7 ml smelled of ammonia. These 7 ml were taken together as "eluate 1". The next 8 ml form "eluate 2" and the rest "eluate 3". The biological titrations gave the following results:

	Temp. °C	Volume ml	log ID _{50/ml}
Before adsorption	22	10	7.4
Filtrate	22	10	5.5
Eluate 1	22	7	7.0
» 2	22	8	7.0
» 3	22	14	5.7

Obviously the virus was adsorbed in the column out of 10 ml approximately 1/5 saturated ammonium sulphate and was eluted at a lower concentration of salt.

The influence of the salt concentration upon the adsorption of viruses has been observed earlier. Thus DELBRÜCK (9) adsorbed bacteriophages on Jena sintered glass filters from 1 % MgCl_2 , NaCl and phosphate buffer solutions and eluted the phages with distilled water. RILEY (6) showed that chicken tumor I (Rous sarcoma) virus could be adsorbed on celite in 0.9 per cent sodium chloride solution and eluted at a lower concentration of the same salt. TISELIUS (unpublished) observed salting out adsorption of the virus of foot and mouth disease in filter paper and suggested the initiation of the work reported here.

The important role often played by the concentration of hydrogen ions on adsorption is well known since long.

This investigation is part of a research program on adsorption analysis which is financed by a grant from the Swedish Natural Science Research Council.

The author wishes to express his gratitude to professor A. TISELIUS for his kind interest and valuable advice.

References to literature: 1. Tiselius, A. Adsorption Separation by Salting Out, *Arkiv Kemi, Min. Geol.*, 26 B, No. 1 (1948). — 2. Bourdillon, J. Attempts at Purification of a Murine Strain of Human Poliomyelitis Virus, *Science* 96, 541 (1942). — 3. — Purification, Sedimentation and Serological Reactions of the Murine Strain of SK Poliomyelitis Virus. *Arch. Biochem.* 3, 285 (1944). — 4. Gard, S. Purification of Poliomyelitis Viruses, *Acta med. scand.* (1943). — 5. Reed, J. L. and Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493 (1938). — 6. Riley, V. T. Application of chromatography to segregation studies of the agent of chicken tumor I (Rous sarcoma) virus. *Science* 107, 573-575 (1948). — 7. Theiler, M. Spontaneous encephalomyelitis of mice — a new virus disease. *J. exp. Med.* 65, 705 (1937). — 8. Theiler, M. and Gard, S. Encephalomyelitis of mice. I. Characteristics and pathogenesis of the virus. *J. exp. Med.* 72, 49 (1940). — 9. Delbrück, M. The growth of bacteriophage and lysis of the host. *J. Gen. Physiol.* 23, 643 (1940).

Note added in proof

The lowest concentration of salt causing adsorption of the virus in paper strips was determined in experiments similar to those first reported. Suspensions of THEILER's virus, partially purified, as mentioned above, by low speed centrifugation, treatment with ether, precipitation at pH 4.3 and low and high speed centrifugation were used. The virus could be eluted equally well by distilled water and by diluted phosphate buffer solution. In the experiments to be reported here 10 ml 0.001 M sodium phosphate buffer solution of pH 7.5 were used to eluate each part of the paper strips. The eluates were titrated in mice. The titers, given as $\log \text{ID}_{50/\text{ml}}$ eluate were as follows (the titers of the eluates from the lowest parts of the paper strips are placed at the bottom of the table):

Concentration of ammonium sulphate	0.420 M	0.210 M	0.042 M	0.005 M	0.001 M*	Distilled water
Log $\text{ID}_{50/\text{ml}}$ eluate	—	—	—	—	5.9	6.8
»	—	—	—	4.2	—	7.1
»	—	5.2	3.9	6.9	6.2	4.1
»	5.6	6.3	6.2	6.8	—	4.2
»	5.8	5.6	6.2	6.1	5.9	4.1

* This strip was cut in only 3 parts.

Thus with 0.042 M ammonium sulphate solution the adsorption of the virus was as good as it was with more concentrated solutions. With 0.005 M ammonium sulphate solution the virus was transported faster. In 0.001 M ammonium sulphate the front of the virus seemed to follow near the front of the solvent but wandered with "a long tail" not leaving the lowest parts of the paper practically free from virus as was the case in distilled water.

To get some further impression as to the possibilities of using salting out adsorption for the purifying of crude virus suspensions an experiment was made with a suspension of infected brains purified only by centrifugation at a low speed and by treatment with ether. When 0.005 M ammonium sulphate solution was passed through the paper the virus remained adsorbed in the lower part of the strip. The 4 parts, when eluted in phosphate buffer as before, gave $\log ID_{50/ml} = 3.4, 5.8, 3.8, \text{---}$.

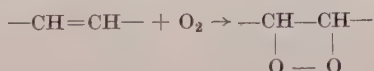
Tryckt den 22 augusti 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über Inhibitoren der Autoxydation von MilCHFett

Von HARRY WILLSTAEDT † und AUGUST REINART

Speisefette können sich bekanntlich bei der Lagerung in verschiedener Weise chemisch verändern. Die eigentliche Ranzigkeit, d. h. das Auftreten freier Fettsäuren ist bei Butter hauptsächlich auf die Tätigkeit von Mikroorganismen zurückzuführen. Seit der Einführung moderner hygienischer Arbeitsmethoden in das Meiereigewerbe ist diese Art der Ranzigkeit beträchtlich weniger häufig zu beobachten als früher. Bei längerer Lagerung können aber andere geschmackliche Veränderungen auftreten, für welche bei der Beurteilung u. a. Ausdrücke wie »alter«, »öliger bezw. traniger«, »käsiger« und »fischiger« Geschmack angewandt werden. Der fischige Geschmack beruht vielleicht auf einer Aufspaltung vorhandener Cholinphosphatide zu Cholin bezw. weiterhin zu Trimethylamin¹, die anderen genannten Geschmacksveränderungen werden nunmehr überwiegend als »Oxydationsfehler« aufgefasst. Man hat anzunehmen, dass sich der Sauerstoff der Luft an die in den ungesättigten Fettsäuren vorhandenen Doppelbindungen anlagert, wobei zunächst Peroxyde entstehen.



Diese Peroxyde zerfallen dann, wobei verschiedene Aldehyde, Ketone und Säuren entstehen können (Zusammenstellung der bisher isolierten Aldehyde und Säuren vgl. ² und ³). Die Bestimmung des Peroxydgehaltes hat sich allmählich zu einer wichtigen Methode der Fettanalyse entwickelt (Peroxydzahl).

Betrachtet man das Auftreten der »Oxydationsfehler« als eine Folge autoxydativer Vorgänge, so liegt der Versuch nahe, den Ablauf dieser Prozesse durch Zusatz geeigneter negativer Katalysatoren⁴ zu verhindern oder doch wenigstens zu verzögern. An Versuchen hierzu hat es während der letzten Jahre in der Fettchemie nicht gefehlt.

Unter den in der Natur vorkommenden Antioxydantien hat sich dabei vor allem das E-Vitamin (α-Tocopherol) und die ihm nahestehenden Substanzen

¹ Vgl. DIEMAIR, Die Haltbarmachung von Lebensmitteln, Stuttgart 1941, S. 118.

² DIEMAIR, l. c., S. 70.

³ HEFTER-SCHÖNFELD, Chemie und Technologie der Fette und Fettprodukte, Wien 1936, Bd. I, S. 421.

⁴ MOUREU und DUFRAISSE, Compt. rend. Acad. Sciences Paris 174, 278 (1922) haben für Substanzen, welche instande sind, Autoxydationsprozesse zu verzögern, die Bezeichnung »Antioxydantien« vorgeschlagen.

(β - und γ -Tocopherol) das Interesse der Forschung zugezogen¹. Andere natürliche Antioxydantien sind z.B. Hafermehl und daraus hergestellte Extrakte² sowie Naturharze wie Guajacharz³. Weiterhin sind zahlreiche chemische Substanzen mit seit lange bekannter Struktur auf ihre Eignung als Antioxydantien untersucht worden, wobei vor allem Hydrochinon und seine Derivate⁴ sowie Gallussäureester⁵ und Nordihydroguajacharzsäure⁶ (für welche in Amerika die Abkürzungen DNDG und NDGA gebräuchlich sind) zu nennen sind. Neuerdings sind auch Monofettsäureester der Ascorbinsäure⁷ (mit grosser Wahrscheinlichkeit ist die Veresterung an der primären Alkoholgruppe der Ascorbinsäure erfolgt) für solche Zwecke herangezogen worden⁸.

Unsere eigenen Versuche zielten vor allem darauf ab, besonders für Butter bzw. Sahne geeignete Antioxydantien aufzufinden.

Methodisches

Zunächst bemühten wir uns, eine für unsere Zwecke geeignete Testmethode auszuarbeiten. Der Grad der Oxydation eines Fettes lässt sich einigermaßen durch die von LEA⁹ empfohlene Peroxydzahl ausdrücken. Aus leicht ersichtlichen Gründen ist es bei Versuchen wie den unsrigen nicht möglich, das spontane Eintreten der oxydativen Veränderungen abzuwarten, sondern man muss den Ablauf des Oxydationsprozesses beschleunigen. Zu diesem Zweck haben RIEMENSCHNEIDER, SWIFT und SANDO¹⁰ Fettproben bei 60° belüftet und danach parallel die Zunahme der Peroxydzahl und die Abnahme der Jodzahl gemessen. Wir haben eine ähnliche Arbeitsweise benutzt, bei welcher zwei Proben, die

¹ Vgl. z.B. BRADWAY und MATTILL, *Journ. Amer. chem. Soc.* 56, 2405 (1934); *Journ. biol. Chem.* 107, 471 (1934); OLCOTT und MATTILL, *Journ. Amer. chem. Soc.* 58, 1627 (1936); OLCOTT und EMERSON, ebenda 59, 1008 (1937); COLUMBIC, ebenda 63, 1142 (1941).

² Literaturangaben z. B. bei DIEMAIR, l.c. S. 518–520.

³ Vgl. z.B. NAGY, BEADLE und KRAYBILL, *Oil and Soap* 22, 123 (1945); SCHMIDT-HEBBEL und MARTINI, *Ann. Quim. Farm.* 1944, 1, zitiert nach *Chem. Abstr.* 1945, 2417⁶.

⁴ OLCOTT, *Journ. Amer. chem. Soc.* 56, 2492 (1934).

⁵ SABALITSCHKA und BOEHM, *Brit. Pat.* 542 833 und 558 100 sowie U.S.A. Pat. 2 255 191; PONT, *Journ. Conn. Sci. Ind. Res.* 18, 53 (1945).

⁶ z.B. STIRTON, TURER und RIEMENSCHNEIDER, *Oil and Soap* 22, 81 (1945); NAGY, BEADLE und KRAYBILL, ebenda 22, 123 (1945); BICKOFF, WILLIAMS und SPARKS, ebenda 22, 128 (1945).

⁷ WELLS und RIEMENSCHNEIDER, U.S.A. Pat. 2 368 435; RIEMENSCHNEIDER und TURER, U.S.A. Pat. 2 375 250 und 2 383 816.

⁸ Hier ist nur eine sehr geringe Anzahl der vorgeschlagenen Substanzen erwähnt worden. Vollständigere Angaben findet man bei DIEMAIR, l.c. S. 519 sowie für die letzten Jahre z.B. bei BERGEL, *Chem. and Ind.* 14, 127 (1944); PISKUR, *Oil and Soap* 22, 84 (1945).

⁹ *Proc. Royal Soc. London* 108, 175 (1931) (jodometrische Methode). Nach STROHECKER, VAUBEL und TENNER lässt sich die Peroxydzahl auch kolorimetrisch auf Grund der Farbreaktion der Peroxydsauerstoffs mit Titansalzen bestimmen (*Fette und Seifen* 44, 246 [1937]). Zahlreiche Autoren (z.B. MATTILL, *Journ. biol. Chem.* 90, 141 [1931]; FRANKE, *Ztschr. f. physiolog. Chem.* 212, 234 [1932]; *Ann.* 493, 132 [1932] und spätere Arbeiten; FRENCH, OLCOTT und MATTILL, *Ind. and Engin. Chem.* 27, 724 [1935]; TAIT und KING, *Biochem. Journ.* 30, 285 [1936]; DIEMAIR und FOX, *Angew. Chem.* 52, 484 [1939]; TÄUFEL und HEINISCH, *Fette und Seifen* 47, 201 [1940]; VOGT-MÖLLER, *Maelkeritidende* 54, 481 [1941]; STIRTON, TURER und RIEMENSCHNEIDER, *Oil and Soap* 22, 81 [1945]) haben direkt die Sauerstoffaufnahme von Fetten manometrisch gemessen. Bei Sahne konnten jedoch wir selber keine günstigen Erfahrungen mit derartigen Methoden machen.

¹⁰ *Oil and Soap* 17, 145 (1940).

eine mit Zusatz von Antioxydans, die andere ohne Zusatz, unter gleichen Bedingungen belüftet und dann hinsichtlich ihrer Peroxydzahl verglichen werden.

Zwei Rundkolben von 250 ccm Inhalt mit Normalschliff 26 werden mit eingeschliffenen, zu Spitzen ausgezogenen Gaseinleitungsrohren und mit eingeschliffenen Kugelkühlern von 75 cm Kühlmantellänge versehen. Die Kolben werden zunächst mit Wasser beschickt, die Gaseinleitungsrohre werden an die Pressluftleitung angeschlossen und man reguliert mit Hilfe von Quetschhähnen den Luftstrom so, dass pro Zeiteinheit die gleiche Anzahl Luftblasen durch beide Kolben passiert. Dann entleert man die Kolben, trocknet sie und beschickt sie mit je 50 g Sahne (mit 35–40 % Fettgehalt) und 30 g Wasser. In den einen Kolben gibt man ausserdem eine geeignete Menge der als Antioxydans zu prüfenden Substanz (falls die Substanz in Lösung angewandt wird, gibt man in den anderen Kolben die entsprechende Menge an reinem Lösungsmittel). Beide Kolben werden dann im Wasserbad auf 65–70° erwärmt und während zwei Stunden belüftet. Der Inhalt der Kolben wird dann in vorgewärmte Zentrifugengläser von 50–60 ccm Inhalt überführt und 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Zentrifugengläser werden dann in einen Kühlschrank (+ 3°) gestellt bis das Fett völlig erhärtet ist. Danach wird ein Spatel in die Fettmasse eingeführt. Beim Eintauchen des Zentrifugenglases in warmes Wasser löst sich der Fettpropfen von der Wandung ab und kann mit Hilfe des Spatels bequem herausgezogen werden. Gewogene Mengen dienen dann zur Bestimmung der Peroxydzahl¹.

Wir bestimmen bei unseren Versuchen die Peroxydzahl sofort nach Ausführung des Belüftungsversuches. Wir haben jedoch bemerkt, dass bei ein- bis zweitägiger Lagerung des Fettes nach Ausführung des Belüftungsversuches die Unterschiede zwischen den mit und ohne Antioxydans belüfteten Proben noch stärker hervortreten.

Man erhält bei dieser energischen Behandlung ziemlich grosse Peroxydzahlen, was für die Sicherheit der Titration von Vorteil ist (im Allgemeinen liegen die Peroxydzahlen des Fettes der ohne Zusatz belüfteten Proben zwischen 1 und 2, bei Zusatz wirksamer Antioxydantien liegen sie unter 1).

Die Peroxydzahl des Fettes der mit Antioxydans versetzten Probe wird dann durch die Peroxydzahl des Fettes der Probe ohne Zusatz dividiert. Je kleiner der Wert des Quotienten

$$Q = \frac{\text{Peroxydzahl mit Antioxydans}}{\text{Peroxydzahl ohne Antioxydans}}$$

ausfällt, um so effektiver ist dann Antioxydans. Hat der Quotient den Wert 1, so ist die verwendete Substanz ohne Wirkung. Ist der Quotient grösser als 1, so liegt kein Antioxydans, sondern ein Oxydationskatalysator vor.

Bezüglich der Auswahl der zu den Versuchen benutzten Sahnen möchten wir folgendes bemerken: Süsses Sahne hat sich bei unseren Versuchen als beträchtlich empfindlicher gegen Oxydation erwiesen als gesäuerte Sahne. Wir benutzen daher vorzugsweise süsse Sahne als Versuchsmaterial. Beim Vergleich der aus verschiedenen Meiereien bezogenen Sahnen hat sich herausgestellt, dass, wie zu erwarten, Sahnen von Meiereien, deren Butter öfters den Geschmacksfehler »ölig« aufweist, als Versuchsmaterial besser geeignet ist, als Sahne von

¹ Wir benutzen zur Bestimmung der Peroxydzahl die von SØRENSEN, Mælkeritidende 50, 667 (1937) angegebene Ausführungsform der jodometrischen Methode.

Meiereien, bei deren Butter dieser Geschmacksfehler nicht auftritt. Die erwähnte besonders grosse Empfindlichkeit der süssen Sahne gegen Oxydation ist auch der Grund dafür, dass wir für unsere Versuche ausschliesslich Sahne und nicht Butter benutzt haben.

Wir sind uns dessen bewusst, dass die hier angegebene Methode nur rohe Resultate liefert und z.B. durch Einschaltung von Gasuhren zur genauen Messung der zur Oxydation angewandten Luftmenge verbessert werden kann. Zur einfachen Entscheidung der Frage, ob einer Substanz Antioxydanzwirkung zukommt oder nicht, erscheint uns die Methode aber durchaus brauchbar.

Versuchsergebnisse

Wir haben zunächst einige in der Literatur empfohlene Antioxydantien untersucht (Nr. 1 bis 4 des folgenden Verzeichnisses). Die bei der Prüfung von carotinoidhaltigem Material (Nr. 5) erhaltenen Ergebnisse führten uns dann zur Untersuchung bisher nicht geprüfter Substanzen.

1. *α -Tocopherol*. Mit Zusätzen von α -Tocopherol bzw. α -Tocopherolacetat haben wir keine günstigen Ergebnisse erzielt. Wir werden jedoch auf diese Frage ausführlicher in einer späteren Arbeit zurückkommen.

2. *Hafermehl*. Bei Zusätzen von etwa 1 % Hafermehl erhält man recht günstige Ergebnisse beim Belüftungsversuch. Wir haben Q-Werte bis herab zu 0,125 erhalten. Für die praktische Anwendung können derartig grosse Zusätze natürlich nicht in Frage kommen. Wir haben daher auch *Hafermehlextrakte* erschöpfende Extraktion des Mehls mit Petroleumäther, Einengen und Fällen der wirksamen Bestandteile mit Aceton hergestellt. Mit Zusätzen von 1 % an so gewonnener Substanz erhielten wir Q-Werte von etwa 0,5, doch scheint sich die wirksame Substanz schnell zu verändern, da nach etwa achttägiger Aufbewahrung des Extrakts die Aktivität (wenigstens bei diesen rohen Präparaten) verschwunden war.

3. *Gallussäureäthylester*. Mit Zusätzen von 1 % erhält man Q-Werte von etwa 0,5. Wir haben die Wirkung dieser Substanz auch in einem praktischen Versuch erproben können.¹ Butter, die unter Zusatz von 0,17 % Gallussäureäthylester hergestellt war, zeigte bei sechzig tägiger Lagerung bei 20° einen Anstieg der Peroxydzahl von 0,0 auf 0,1, während die ohne Zusatz von Gallussäureäthylester hergestellte Kontrolle nach dieser Zeit eine Peroxydzahl von 0,86 aufwies. Der Gallussäureäthylester erteilt jedoch der Butter einen bitteren Geschmack und eine unnatürliche graue Farbe.

4. *Nordihydroguajacharzsäure*. Sowohl mit einem von uns selbst aus Guajacharz nach der Vorschrift von SCHROETER, LICHTENSTADT und IRINEU² hergestellten Präparat als auch mit einem von Herrn Prof. THOMÉ dankenswerterweise überlassenen Präparat amerikanischer Herkunft erhielten wir bei einer Konzentration von 1 % im Belüftungsversuch regelmässig Q-Werte von 0,6–0,7.

¹ Wir möchten auch an dieser Stelle Herrn Professor K. E. THOMÉ in Alnarp für sein Entgegenkommen bei der Durchführung dieses und des nachfolgenden praktischen Versuches unseren allerbesten Dank aussprechen.

² Ber. dtsch. chem. Ges. 51, 1600 (1918).

capentaenal auch ein stark ungesättigtes Keton in den Bereich der Untersuchung zu ziehen. Wir wählten hierfür das von KARRER und COCHAND¹ beschriebene Di-(ω -phenylbutadienyl)-diketon



und fanden, dass diese Verbindung eine stark oxydationsfördernde Wirkung ausübt ($Q = 1,97$). Wir untersuchten danach noch einen weiteren in der Natur vorkommenden hochungesättigten Aldehyd, nämlich das von WILLSTAEDT² aus dem echten Reizker isolierte Lactaroviolin. Die Konstitution dieser Verbindung ist zwar noch nicht völlig geklärt, jedoch steht fest, dass sie eine Aldehydgruppe enthält, die mit den fünf Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen eines Azulenringes konjugiert ist³. Lactaroviolin wirkt im Belüftungsversuch noch in Konzentrationen von 0,2 % kräftig oxydationshemmend ($Q = 0,33-0,5$). Dass diese Wirkung mit dem Vorhandensein der Aldehydgruppe im Molekül zusammenhängen muss, geht daraus hervor, dass der aus dem gleichen Pilz isolierte Kohlenwasserstoff Lactarazulen⁴ auch in zehnfach grösserer Konzentration nur eine unsichere Wirkung entfaltet ($Q = 0,8-0,9$; die Titration ist durch die blaue Eigenfarbe des Azulens erschwert und unsicher).

Der Schutzeffekt des Lactaroviolins bleibt auch bei sehr langer Aufbewahrung bestehen. Eine am 26.6. 1945 mit Zusatz von 0,2 % Lactaroviolin belüftete Probe hatte sofort nach der Belüftung eine Peroxydzahl von 0,32, am 18.10. 1945, also nach fast viermonatlicher Aufbewahrung im offenen Kolben bei Zimmertemperatur und ohne Ausschluss des Lichtes, war die Peroxydzahl 0,54, am 29.10. 1946, also nach 16 Monaten war sie 1,24. Die Probe nach dieser langen Zeit wies nur einen schwach ranzigen Geruch auf.

Zum Mechanismus der Antioxydanzwirkung. Gewöhnlich wird angenommen⁵, dass die Wirkung der Antioxydantien so zu erklären ist, dass die Antioxydantien leichter oxydiert werden als die von ihnen geschützten Substanzen und dass erst nach ihrer Zerstörung die eigentliche Oxydation einsetzt. Ob dieser Mechanismus auch bei den hier beschriebenen, sehr oxydationsbeständigen Antioxydantien zutreffen kann, lässt sich gegenwärtig noch nicht entscheiden.

Wir glauben somit, in den hochungesättigten Aldehyden des hier beschriebenen Typus eine neue Klasse von Antioxydantien aufgefunden zu haben. Wir beabsichtigen, weitere Vertreter dieser interessanten Körperklasse zu prüfen und auch zu versuchen, dem Mechanismus des Schutzeffektes dieser Verbindungen näher zu kommen.

Svenska Mejeriernas Riksförening u.p.a. in Stockholm sind wir für grosszügigste materielle Unterstützung unserer Untersuchungen zu wärmstem Dank verpflichtet.

¹ Helv. chim. Acta 28, 1181 (1945).

² Ber. dtsh. chem. Ges. 68, 333 (1935).

³ WILLSTAEDT, Atti X. Congr. internaz. Chim. pura e applic. Roma 1938, Band III, S. 390 (1939); Svensk Kem. Tidskr. 58, 23 (1946); KARRER, RUCKSTUHL und ZBINDEN, Helv. chim. Acta 28, 1176 (1945); PLATTNER und HEILBRONNER, Experientia 1, 233 (1945).

⁴ WILLSTAEDT, Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 997 (1936).

⁵ Vgl. z.B. DIEMAIR, l.c. S. 520 und 521; HAMILTON und OLCOTT, Oil and Soap 13, 127 (1936); FRENCH, OLCOTT und MATTILL, Ind. and Engin. Chem. 27, 724 (1935).

Zur Kenntnis der Reduktone V.

Von HANS v. EULER und HANS HASSELQUIST

I. Buten-diol (Butadien-diol) und p-Xylochinon aus Diacetyl

In der vorhergehenden Mitteilung¹ wurde erwähnt, dass Diacetyl² zwar nicht unmittelbar, aber nach kurzer Einwirkung von Alkali in der Wärme eine solche Veränderung erfährt, dass die Lösung Tillmans' Reagenz (TR) schnell entfärbt. Ein quantitativ durchgeführter Titrationsversuch zeigte, dass auf 1 Mol Diacetyl 1 Endiol-Gruppe entsteht.

Um die hierbei auftretenden Produkte präparativ zu erfassen wurden folgende Versuche angestellt:

Durch Benzoylierung des durch alkalische Behandlung von Diacetyl erhaltenen Reaktionsproduktes wurde eine Substanz (78) in Form farbloser, verfilzter Nadeln erhalten, welche ohne Zersetzung konstant bei 157°—158° schmolzen; sie sind in Äther und Aceton leichtlöslich, in Äthylalkohol und Eisessig mässig löslich, in Wasser sowie in Alkalilauge und in Petroleumäther unlöslich.

Verseifung der Subst. 78. Die wässrige Lösung der Subst. 78 wurde in 1/4 norm. Methanol-Natronlauge 2 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt; nach Abkühlung der auf pH = 6.2 neutralisierten Lösung wurde dieselbe wiederholt mit Benzol ausgeschüttelt. Beim Einengen der benzolischen, gelbbraunen Lösung destillierte mit dem Benzol eine kräftig gelb gefärbte Substanz (A) über (Destillat I). Durch vorsichtige Destillation wurde nun die gelbe Substanz von der Hauptmenge des Destillates getrennt. Aus diesem schied sich bei Zimmertemperatur ein Gemisch gelber und farbloser Nadeln ab. Mit etwas Petroleumäther gingen nun die gelben Krystalle in Lösung und lieferten nach Abdunsten des Petroleumäthers ein gelbes Pulver vom Schmp. 97°—106°. Bei Versuchen, dieses aus Petroleumäther umzukrystallisieren verflüchtigte sich dasselbe schon bei Zimmertemperatur.

Durch Zusatz von Petroleumäther zum stark eingengten »Destillat I« fiel eine braune, zunächst ölige, später erstarrende Masse aus, die mit Petroleumäther abgespült wurde. Sie ging auf Zusatz von etwas Methanol leicht in Lösung. Aus dieser Lösung wurden mit Wasser mikroskopisch kleine, hellbraune Blättchen gefällt, welche mit etwas wässrigem Methanol gewaschen und dann getrocknet wurden. Schmp. 208°—210° Subst. B.

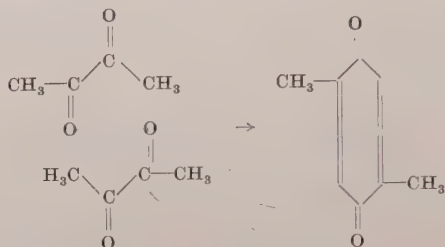
Nitrierung der Subst. 78. Durch Behandlung mit rauchender Salpetersäure sp. Gew. 1,52 ging Subst. 78 unter Wärme- und Gas-Entwicklung sofort in Lösung.

¹ Vorhergehende Mitteilungen dieser Serie: EULER, H. HASSELQUIST und U. LÖÖV: I. Dieses Archiv 26 B No 5 (1948), II. Dieses Archiv 26 B No 8 (1948), III. Dieses Archiv 26 A No 17 (1948).

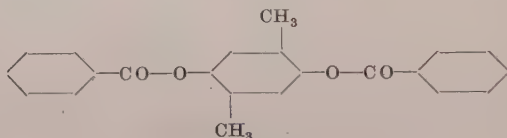
² EULER u. H. HASSELQUIST, Dieses Archiv, 26 A No. 25 (1949).

Nach Abkühlung wurde viel Wasser zugegeben, wodurch ein gelbes Öl ausfiel, das durch Reiben in gelben Nadeln krystallisierte. Die mit Wasser sorgfältig gewaschenen Krystalle wurden dann in gelben Rhomben vom Schmp. 136° — $137,5^{\circ}$ erhalten. Subst. C.

Vor mehr als 60 Jahren hatte H. v. PECHMANN¹ in Baeyers Laboratorium gefunden, dass Diacetyl in alkalischer Lösung (über Dimethylchinogen) zu p-Xylochinon kondensiert wird.



Das durch Reduktion des p-Xylochinons gebildete p-Xylohydrochinon wird durch 2 Mol Benzoylchlorid vollständig benzoyliert:



Subst. 78

Unsere durch Benzoylierung des alkalisch behandelten Diacetyls erhaltene Substanz 78 stimmt mit dem von STAEDEL und HÖLZ² beschriebenen Di-benzoyl-p-xylohydrochinon bezgl. Schmelzpunkt (157° — 158°), Krystallform, Löslichkeit und Zusammensetzung vollkommen überein.

Analyse: Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_4$	C = 76,28 %	H = 5,24 %
Gefunden	75,60 %	5,20 %

Benzoyl-Bestimmung. 51,2 mg Subst. 78 wurden mit 5 ml 1 n. NaOH und 15 ml Methanol versetzt und unter Rückfluss $3\frac{1}{2}$ Stunden lang gekocht. Dann wurde die Reaktionslösung mit den gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit HCl neutralisiert und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und vom Äther befreit. Der Rückstand wurde mit 50 ml Alkohol aufgenommen. Um die gelbe Lösung zu entfärben wurden 15 ml derselben mit Tierkohle aufgeköcht, filtriert, gewaschen und auf 25 ml verdünnt. Mit 10 ml dieser entfärbten Lösung wurde die Titration mit einer 0,01165 n. NaOH-Lös. vorgenommen (Phenolphthalein als Indikator). Verbrauch: 2,85 ml der 0,01165 n. Natronlauge.

$$\begin{aligned} \text{Benzoyl gef.} & \frac{105 \cdot 2,85 \cdot 0,01165 \cdot 50}{51,2 \cdot 6} = 56,7 \% \\ \text{ber.} & = 60,7 \% \end{aligned}$$

¹ H. v. PECHMANN, Chem. Ber. 21, 1411 (1888).

² STAEDEL u. HÖLZ, Chem. Ber. 18, 2923 (1885).

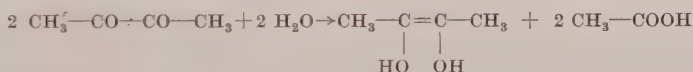
Die bei der Verseifung der Subst. 78 erhaltene Substanz B (S. 325) konnten wir als p-Xylo-hydrochinon identifizieren. Der von NIETZKI¹, dem Entdecker des p-Xylo-hydrochinons angegebene Schmp 212° stimmt mit dem von uns gefundenen Schmp. 208—210° befriedigend überein.

Durch Oxydation der Substanz B erhielten wir die in gelben Nadeln krystallisierende Substanz A; sie wurde als p-Xylochinon mit Sicherheit erkannt, obwohl die Flüchtigkeit unseres Produktes eine genaue Bestimmung des Schmp. nicht gestattete.

Schliesslich haben wir unsere Substanz 78 noch durch ihr Nitrierungsprodukt gekennzeichnet: Staedel und Hölz geben für das Nitroderivat des Di-benzoyl-p-xylo-hydrochinons den Schmp 138—139° an, während wir für die Substanz C den Schmp 136°—137,5° fanden.

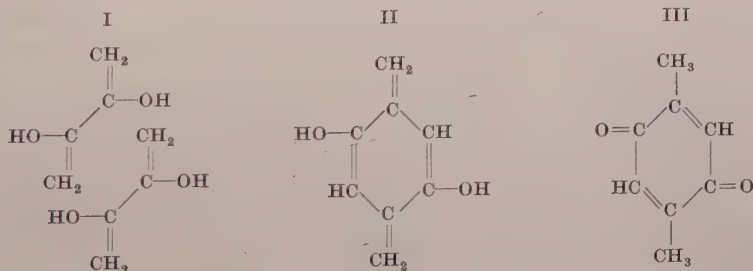
Durch die beschriebenen Versuche dürfte also festgestellt sein, dass wir bei der Einwirkung von Alkali auf Diacetyl u. a. p-Xylochinon und p-Xylo-hydrochinon erhalten haben. Was nun die Bildung eines Endiols betrifft, und zwar in der Eingangs erwähnten Ausbeute, so lässt sich für den Reaktionsverlauf die folgende Darstellung geben:

Unter der Einwirkung von Alkali findet zwischen 2 Molekülen Diacetyl eine Oxydo-Reduktion in der Weise statt, dass 1 Mol Diacetyl zu Buten-diol reduziert wird, während das zweite Mol. Diacetyl durch 2 OH oxidativ zu 2 Mol Essigsäure gespalten wird, also der Gleichung entsprechend:



Entstehen aus 1 Mol des Buten-diols 2 Mol Essigsäure, so werden hierzu 2 Äquivalente TR verbraucht. Gleichzeitig wird das primär aus Diacetyl entstehende p-Xylochinon zu p-Xylohydrochinon reduziert.

Wir ziehen aber auch nachstehende Reaktionsfolge I → II → III in Betracht, bei welcher wir von dem Butadien-diol $\text{CH}_2 = \underset{\text{HO}}{\underset{|}{\text{C}}} - \underset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{C}}} = \text{CH}_2$ ausgehen:



Wir können diese Auffassung noch durch keine Analogien stützen, versuchen aber, Modelle für den Übergang IV V darzustellen²



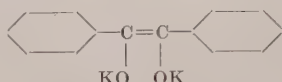
¹ NIETZKI, Lieb. Ann. 215, 169 (1882).

² Siehe hierzu auch: EULER, E. ADLER, H. HASSELQUIST u. M. LUNDIN, Dieses Archiv 18 A No 7 (1944).

II. Stilben-diol aus Benzoin

In der vorhergehenden Mitteilung wurde ein Versuch angegeben, bei welchem durch Einwirkung von 2 n. Natronlauge auf Benzoin das entsprechende Endiol in einer Ausbeute von 75 % erhalten wurde. (Eine direkte Oxydation des nicht in Endiol umgewandelten Benzoins durch TR hat diesen Versuch nicht beeinflusst.)

Dieses aus Benzoin erhaltene Redukton entspricht dem Alkalisalz, das schon vor langer Zeit von BECKMANN und PAUL¹ sowie von WILH. SCHLENK² durch Einwirkung von metallischem Kalium auf Benzil und dann von H. STAUDINGER³, SCHEIBLER⁴ sowie von SCHEUING und HENSLE⁵ durch Einwirkung von Kaliumalkoholat auf Benzoin in alkoholischer Lösung erhalten wurde.



Die Bildung von Reduktonen aus Acyloinen, die eine ganz allgemeine Reaktion zu sein scheint, wird hier mittels des Tillmans'schen Reagenzes weiterhin verfolgt werden.

III. Äthen-diol, das erste Glied der Reduktone

Äthen-diol, isomer mit Glykolaldehyd, wird am geeignetsten aus Dioxymaleinsäure nach der Vorschrift von PARNAS und BAER⁶ gewonnen. Die von H. J. FENTON⁷ und von J. U. NEF⁸ mitgeteilten Verfahren zur Darstellung von Dioxymaleinsäure sind von NEUBERG⁹ wesentlich verbessert worden. NEUBERG führt die Oxydation von Weinsäure mittels Wasserstoffsuperoxid und Ferrosulfat bei Temperaturen unter -2° durch. Wir verweisen auf seine Angaben. Zur Darstellung des Äthen-diols¹⁰ haben wir folgendermassen gearbeitet:

6,7 mg Dioxymaleinsäure wurde mit 10 ml Wasser in einem 50 ml-Rundkolben im Stickstoffstrom versetzt. Der austretende Gasstrom wurde durch einen zu $\frac{2}{3}$ mit Barytlösung gefüllten schmalen Cylinder geleitet. Der Rundkolben wurde auf dem Wasserbad bei 60° 45 Min. lang erwärmt, wobei BaCO_3 in der Vorlage ausfiel. Es wurde abfiltriert und gewogen. Den Kolbeninhalt liess man auf Zimmertemperatur erkalten unter andauerndem Durchströmen von Stickstoff.

6,7 mg Dioxymaleinsäure, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ergaben 13,8 mg BaCO_3 ; somit spaltete 1 Mol Dioxymaleinsäure 1,93 Mol CO_2 bei 60° ab.

Der Kolbeninhalt wurde im andauernden Stickstoffstrom mit einigen Tropfen einer 0,01-n. TR-Lösung versetzt. Entfärbung trat nicht ein. Erst auf Zusatz von 0,5 ml 2-n. NaOH wurde TR sofort entfärbt, sodass nun die Titration bis zum Umschlag fortgesetzt werden konnte. Verbrauch: 6,6 ml 0,01-n TR.-Lös.

¹ E. BECKMANN u. PAUL, Lieb. Ann. 266, 1 (1891).

² WILH. SCHLENK, Chem. Ber. 46, 2840 (1913).

³ H. STAUDINGER u. Helv. 5, 703 (1922).

⁴ G. SCHEIBLER, Lieb. Ann. 434, 265 (1923).

⁵ G. SCHEUING u. A. HENSLE, Lieb. Ann. 440, 72 (1925).

⁶ J. PARNAS u. J. BAER, Biochem. Z. 41, 412 (1912).

⁷ H. J. FENTON, J. Chem. Soc. 65, 899 (1894). — 67, 48. — 69, 546.

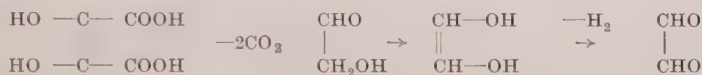
⁸ J. U. NEF, Lieb. Ann. 357, 290 (1907).

⁹ C. NEUBERG u. E. SCHWENK, Biochem. Z. 71, 104 (1915).

¹⁰ H. J. FENTON, J. Chem. Soc. 71, 375 (1897).

Diesem Verbrauch zufolge würden auf 1 Mol. Glykolaldehyd 0,91 Mol. Dienol entstanden sein. Der Umstand, dass etwas weniger als 1 Mol. Dienol gebildet wurde dürfte darauf beruhen, dass während der 45 Min. dauernden Erwärmung auf 60° eine kleine Polymerisation des Glykolaldehyds eingetreten war.

Das Reaktions-Schema ist offenbar folgendes:



Reduktone haben wir bis jetzt aus 3 Klassen von Stoffen erhalten:

1. Aus Zuckerarten, u. zw. Aldo- und Keto-Zuckern. Wir konnten bis jetzt als Ausgangsmaterial verwenden:

Glykolaldehyd, Triosen (Dioxyaceton und Glycerinaldehyd) Pentosen, Hexosen und Maltose.

2. Diacetyl, als Vertreter von α -Diketonen,

3. Benzoin als Vertreter von Acyloinen.

Unter den schon früher bekannt gewordenen Stoffen, welche unter die Reduktone einzureihen sind, seien erwähnt:

Ascorbinsäure und deren Analoge und Homologe, Hexuronsäuren, Dioxymaleinsäure, Reduktinsäure (REICHSTEIN) Oxy- und Aminotetronsäure (MICHEEL).

Eine den eigentlichen Reduktonen nahestehende Substanzgruppe bilden die *o*-Diphenole, unter welchen ausser dem Brenzcatechin noch Pyrogallol, Adrenalin und Noradrenalin genannt seien. Ihr Verhalten zu Tillmans' Reagenz und zu gewissen anderen Oxydationsmitteln wird in folgenden Untersuchungen besonders behandelt werden.

Als Ausgangsmaterial für Redukton seien noch p-Chinone und Cyclohexanole erwähnt, deren oxydative Spaltung uns um so mehr interessiert hat, als Inosit ein weitverbreiteter Wuchsstoff ist, dessen Rolle im Tierkörper noch keinerlei Aufklärung gefunden hat.

Titration von Meso-Inosit mit Tillmans' Reagenz

3,2 mg Inosit wurden im Stickstoffstrom in 10 ml l-n. Natronlauge gelöst und mit 0,01-n. Tr-Lösung im Stickstoffstrom bei 95° titriert. Verbrauch: 7,0 ml der 0,01-n. TR-Lösung, entsprechend 1,98 Mol Dienol auf 1 Mol. Inosit (Mol Gew. 180).

Bei der Aufklärung dieser Reaktion haben wir bemerkenswerte Angaben befunden in einer Arbeit von P. FLEURY, G. POIROT und M^{me} JEAN FIEVET.¹

Diese Autoren haben die Einwirkung von Perjodsäure auf Inosit und dessen Zerfall unter Sauerstoffaufnahme studiert und haben dabei die Entstehung von Glykolsäure neben Ameisensäure festgestellt. Bezgl. des Reaktionsverlaufes haben sie die folgende Hypothese aufgestellt:

In einer sehr schnell verlaufenden 1. Phase, in welcher 4 Sauerstoffatome pro Mol Inosit aufgenommen werden, soll eine symmetrische Aufspaltung des Ringes unter Bildung von 2 Molekülen Tartrondialdehyd stattfinden. »Ce composé subirait immédiatement une transposition aldocéto-sique, pour donner l'aldehyde hydroxypyru-

¹ P. FLEURY, G. POIROT und M^{me} JEAN FIEVET, C. r. de l'Acad. des Sciences (Paris) 220, 664 (1945).

vique $\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CHO}$. . . Bien que cet aldéhyde hydroxypyruvique n'ait pas été isolé, c'est à lui qu'on devrait vraisemblablement rapporter le pouvoir mercuroréducteur, dont le maximum correspond bien, ici, à la consommation des deux premiers atomes d'oxygène.»

Das von den französischen Autoren erwähnte stark reduzierende Spaltprodukt ist offenbar identisch mit dem mit Hydroxybrenztraubenaldehyd isomeren Enol-Tartronaldehyd (Redukton), das durch Oxydation in Tartrondialdehyd übergeht.

Was noch aussteht ist der Vergleich unserer im obigen Versuch eingehaltenen Bedingungen mit denjenigen, unter welchen die französischen Autoren die Aufspaltung des Inosits durchgeführt haben.¹

Endiol-Bildung aus Zuckerarten

In einer der ersten Mitteilungen über die Reaktion von Dichlorphenol-Indophenol mit alkalisch behandelten Zuckerarten wurde bereits erwähnt, dass ausser Glucose auch Pentosen sowie Maltose analoge Reduktionswirkungen ausüben.²

Die nunmehr mit *Maltose* angestellten quantitativen Versuche haben ergeben, dass 1 Mol Maltose 2 Mol Redukton entspricht. Das Ergebnis ist insofern auffallend, als man nicht annehmen sollte, dass bei der angewandten Alkalinität eine Hydrolyse der Maltose eintritt. In diesem Fall würde man also erwarten, dass nur der Glucose-Rest, welcher die freie Aldehydgruppe trägt, die Umlagerung in Redukton erfährt. Es muss aber hier auch betont werden, dass aus Maltose das entstandene Redukton nicht ausgefällt bzw. isoliert wurde. Es bleibt also immerhin die Möglichkeit offen, dass hier die Spaltung in anderer Weise verläuft als bei der Glucose.

Das Gleiche gilt bezüglich der neuerdings untersuchten Methyl-Pentose *Rhamnose*.

Aus 5,0 mg Rhamnose, die bei 75° mit 0,01 n. TR-lösung titriert wurde, fanden wir einen Verbrauch von 5,8 ml TR-lösung, entsprechend 0,91 Mol gebildetes Dienol per 1 Mol Rhamnose.

¹ Biochemische Oxydation über A-Inosose: B. MAGASANIK u. E. CHARGOFF, J. Biol. Chem. 175, 939 (1948).

² EULER u. KLUSMANN, Dieses Archiv 11 B Nr 8 (1933).

Tryckt den 6 september 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Studien zur Chemotherapie der Tuberculose. V

Von HARRY WILLSTAEDT †, MARTHE BORGGÅRD und KARL MYRBÄCK

In der ersten Mitteilung dieser Untersuchungsreihe beschrieb H. WILLSTAEDT (1) die Darstellung einiger Azofarbstoffe durch Kuppelung von diazotiertem Sulfanilamid, Sulfapyridin und Sulfathiazol mit 2-methyl-1-naphtylamin. Einige Triphenylmethanfarbstoffe, dieselben oder ähnliche Komponenten enthaltend, wurden ebenfalls dargestellt. WILLSTAEDT ging bei der Synthese dieser Verbindungen vom Gedanken aus, durch Kuppelung von chemotherapeutisch wirksamen Verbindungen mit 2-Methylnaphthalinderivaten zu Azofarbstoffen gelangen zu können, die dank der phthiocolähnlichen Struktur eines Komponenten die Fähigkeit besitzen sollten, in die Tuberkelbazillen einzudringen und ihre Entwicklung zu hemmen. In der zweiten Mitteilung (2) wurden u. a. einige entsprechende Derivate des p-Aminoacetophenons dargestellt. Eine bakteriologische Prüfung erfolgte durch P. KALLOS.

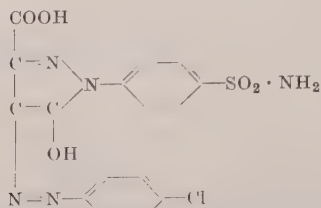
Da die biologische Wirkung einer cyklischen Verbindung beim Übergang zu einer isosteren cyklischen Verbindung meistens erhalten bleibt, so synthetisierten WILLSTAEDT und BORGGÅRD (3), von verschiedenen Methylchinolinen ausgehend, eine Reihe von Azoverbindungen. Später synthetisierten dieselben Autoren (4) eine Reihe von Stoffen, in welchen das 2-Methylnaphthalin durch das isostere 2-Methylindol ersetzt wurde. Die Synthese der hier unten zu beschreibenden Stoffen wurde von WILLSTAEDT und BORGGÅRD angefangen. Nach dem Tode HARRY WILLSTAEDTS haben wir (M. B. und K. M.) das Material zusammengestellt und ergänzt und wollen hier kurz die Synthese einiger Verbindungen erwähnen, die im allgemeinen von 2-Methylnaphthalin bzw. Pyrazol abstammen. Die bakteriologische Prüfung dieser und früher in den Mitteilungen 1, 3 und 4 beschriebener Stoffe ist von B. ZETTERBERG ausgeführt und in seiner Dissertation ausführlich beschrieben worden (5). Dabei wurden nicht nur die Farbstoffe sondern in vielen Fällen auch Methylnaphthalin und die strukturähnlichen Stoffe berücksichtigt.

Beschreibung der Versuche

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-carboxy-5-oxy-pyrazol-(4-azo-4)-1-chloranilin (W 46)

Formel (I)

0,46 g p-Chloranilin werden gepulvert und mit 2 ml konz. Salzsäure kurz erwärmt. Dann setzt man 25 ml kochendes Wasser zu, wobei alles in Lösung geht. Die Lösung wird abgekühlt und mit einer Lösung von 0,35 g Natriumnitrit diazotiert.



Formel (I), W 46.

1,4 g 1-(p-Sulfonamidophenyl)-pyrazol-5-on-3-carbonsäure (Tartrazinogensulfonsäure-S-amid; Darstellung siehe (6)) werden in einer Lösung von 1,5 g NaOH in 30 ml Wasser gelöst. Die Diazolösung lässt man in die alkalische Lösung einfließen. Nach Stehen über Nacht wird der Farbstoff mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, abgesaugt und ausgewaschen. F. 237° (Zers.).

68,45 mg SbSt. 97,40 mg CO₂. 15,50 mg H₂O.

C₁₆H₁₂O₅N₅SCl (421,81). Ber. C 45,6 %, H 2,87 %.

Gef. C 45,5 %, H 2,85 %.

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-carboxy-5-oxy-pyrazol-(4-azo-2)-1-chloranilin (W 47)

Analoge Darstellung aus o-Chloranilin. F. 231° (Zers.).

10,93 mg SbSt. 18,28 mg CO₂. 2,78 mg H₂O.

Ber. C 45,6 %. H 2,87 %.

Gef. C 45,6 %. H 2,85 %.

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-carboxy-5-oxy-pyrazol-(4-azo-3)-1-chloranilin (W 48)

Analoge Darstellung aus m-Chloranilin. F. 232° (Zers.).

9,91 mg SbSt. 16,68 mg CO₂. 2,63 mg H₂O.

Ber. C 45,6 %. H 2,87 %.

Gef. C 45,9 %. H 2,63 %.

72,70 mg SbSt. 122,05 mg CO₂. 19,10 mg H₂O.

Gef. C 45,9 %. H 2,94 %.

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-carboxy-5-oxy-pyrazol-(4-azo-2)-1,4-dichloranilin (W 49)

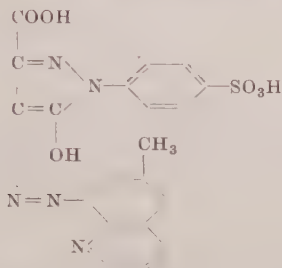
Analoge Darstellung aus 0,81 g 2,5-Dichloranilin in 5 ml konz. Salzsäure und 5 ml Wasser. Pyrazolonderivat in 5 g NaOH und 30 ml Wasser. Bei der Kuppelung trat Fällung ein. Die Mischung wurde mit Wasser verdünnt, über Nacht stehen gelassen, filtriert und mit verd. Salzsäure gefällt. F. 221° (Zers.).

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-carboxy-5-oxy-pyrazol-(4-azo-4)-1,3-dichloranilin (W 40)

Der Farbstoff wurde wie W 49, aber unter Anwendung von 2,4-Dichloranilin dargestellt. F. 253° (Zers.).

1-(Phenyl-p-sulfonsäure)-3-carboxy-5-oxypyrazol-(4-azo-8)-6-methylchinolin (W 68)
Formel (II)

1,6 g 6-Methyl-8-aminochinolin werden in 30 ml Wasser und 5 ml konz. Salzsäure gelöst und mit einer Lösung von 0,7 g Natriumnitrit diazotiert. 2,7 g Tartrazinogensulfonsäure (aus Oxalessigester und Phenylhydrazin-p-sulfon-



Formel (II), W 68.

säure dargestellt (6)) werden in 30 ml Wasser mit 3,4 g NaOH gelöst. Die Diazolösung lässt man langsam zur alkalischen Lösung fließen, lässt über Nacht stehen, filtriert, wäscht aus und trocknet. F. 325° (Zers.).

10,03 mg Sbst. 19,34 mg CO₂. 3,37 mg H₂O.

C₂₀H₁₅O₆N₅S (453,42). Ber. C 53,0 %. H 3,33 %.

Gef. C 52,6 %. H 3,76 %.

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-carboxy-5-oxypyrazol-(4-azo-8)-6-methylchinolin (W 59)

1,6 g 6-Methyl-8-aminochinolin werden wie oben diazotiert. 2,8 g 1-(p-Sulfonamidophenyl)-pyrazol-5-on-3-carbonsäure werden in einer Lösung von 3 g NaOH in 30 ml Wasser aufgelöst. Die Diazolösung wird langsam zur alkalischen Pyrazolonlösung zugegeben. Die Kuppelung tritt sofort ein. Nach Stehen über Nacht wird mit verd. Salzsäure gefällt, gewaschen und getrocknet. F. 228° (Zers.).

41,2 mg Sbst. 80,50 mg CO₂. 13,90 mg H₂O.

C₂₀H₁₆O₅N₆S (452,44). Ber. C 53,31 %. H 3,56 %.

Gef. C 53,32 %. H 3,78 %.

49,6 mg Sbst. 97,00 mg CO₂. 15,50 mg H₂O.

Gef. C 53,37 %. H 3,50 %.

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-methyl-5-oxypyrazol-(4-azo-8)-6-methylchinolin (W 130)

Darstellung wie bei W 59 aber unter Anwendung von 1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-methyl-pyrazolon-5. F. 211°.

1-Phenyl-3-methyl-5-oxy-pyrazol-(4-azo-5)-6-methylchinolin (W 133)

Nach derselben Vorschrift aus 5-Amino-6-methylchinolin und 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolon-5 dargestellt. F. 228–230° (Zers.).

7,34 mg Sbst. 1,301 ccm N₂ (27,5°, 773 mm Hg).

C₂₀H₁₇ON₅ (343,38). Ber. 20,39 % N.

Gef. 20,47 % N.

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-methyl-5-oxy-pyrazol-(4-azo-5)-6-methylchinolin (W 66)

Darstellung wie bei W 59 aber mit 5-Amino-6-methylchinolin als Ausgangsmaterial. F. 245° (Zers.).

1-(p-Sulfonamidophenyl)-3-methyl-5-oxy-pyrazol-(4-azo-8)-chinolin (W 97)

1,44 g 8-Aminochinolin werden in 30 ml Wasser und 5 ml konz. Salzsäure gelöst und mit einer Lösung von 0,7 g Nitrit diazotiert. 2,8 g 1-(p-Sulfonamidophenyl)-pyrazol-5-on-3-carbonsäure werden in einer Lösung von 3 g NaOH in 30 ml Wasser gelöst. Man lässt die Diazolösung langsam zur Pyrazolonlösung fließen. Das Gemisch bleibt über Nacht stehen, wonach der Farbstoff mit verdünnter Salzsäure gefällt, abgesaugt und ausgewaschen wird. F. 227° (Zers.).

8-Oxy-2-methylnaphthalin-(5-azo-4)-benzol-1-sulfonsäureamid (W 103)

1,72 g Sulfanilamid werden in 10 ml Wasser und 3 ml konz. Salzsäure gelöst und mit 0,7 g NaNO₂ diazotiert. Die Diazolösung gibt man portionenweise unter Rührung zu einer Lösung von 1,58 g 2-Methyl-8-naphthol in 30 ml Wasser + 1,7 g NaHCO₃ + 1,8 g NaOH. Nach beendeter Zugabe der Diazolösung setzt man noch eine Lösung von weiteren 0,5 g NaOH zu, wobei alles mit tiefroter Farbe in Lösung geht. Am nächsten Tage wird filtriert, mit verd. Salzsäure gefällt, abgesaugt, gewaschen und getrocknet. F. 165° (Zers.).

54,65 mg Sbst. 120,60 mg CO₂. 21,90 mg H₂O.

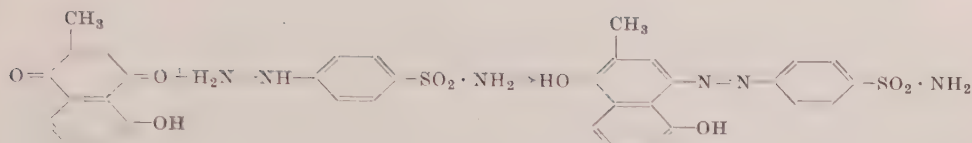
C₁₇H₁₅O₃N₃S (341,37). Ber. C 59,75 %. H 4,43 %.

Gef. C 60,03 %. H 4,48 %.

1,5-Dioxy-2-methylnaphthalin-(4-azo-4)-benzol-1-sulfonsäureamid (W 105)

Formel (III)

0,5 g Plumbagin (2-Methyl-5-oxy-1,4-naphthochinon, (7)), werden mit dem gleichen Gewicht p-Sulfonamidophenylhydrazin, 5 ml Alkohol und 0,5 ml Eisessig 1/2 Stunde unter Rückfluss gekocht. Man versetzt mit Wasser bis zur bleibenden Trübung. Nach Stehen über Nacht bei 0° wird abgesaugt.

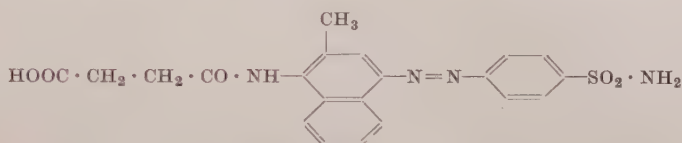


Formel (III), W 105.

1-Succinoylamido-2-methylnaphthalin-(4-azo-4)-benzol-1-sulfonsäureamid (W 18)

Formel (IV)

1 g gepulvertes 2-Methyl-1-aminonaphthalin-(4-azo-4)-benzol-1-sulfonsäureamid (W 14, siehe (1)), und 1 g Bernsteinsäureanhydrid werden zusammen im Metallbad während 15 Minuten auf 160° erhitzt. Nach dem Erkalten wird zweimal



Formel (IV), W 18.

mit je 25 ml Benzol ausgekocht und getrocknet. Dann wird in heisser, verdünnter Sodalösung gelöst, von geringen Mengen ungelöster Substanz abfiltriert und nach dem Erkalten mit verdünnter Salzsäure gefällt. Die Substanz wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. F. 211° (Zers.).

43,4 mg Sbst. 90,30 mg CO₂. 17,10 mg H₂O.

C₂₁H₂₀O₅N₄S (440,46). Ber. C 57,26 %. H 4,58 %.

Gef. C 56,8 %. H 4,60 %.

4-Amino-2-methylnaphthalin-(1-azo-4)-benzol-1-sulfonsäureamid (W 104)

0,86 g Sulfanilamid werden in 1 ml konz. Salzsäure und 5 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung von 0,35 g NaNO₂ diazotiert. Die Diazolösung gibt man in eine Lösung von 1 g 2-Methyl-4-naphthylamin-chlorhydrat in 25 ml Alkohol. Nach Stehen über Nacht wurde die entstandene Fällung abgesaugt. Die Mutterlauge wurde mit NH₃ alkalisiert und mit Wasser gefällt. Abgesaugt und aus Alkohol umkrystallisiert. F. etwa 165°.

15,40 mg Sbst. 10,18 mg BaSO₄.

C₁₇H₁₆O₂N₄S (340,39). Ber. S 9,41 %.

Gef. S 9,08 %.

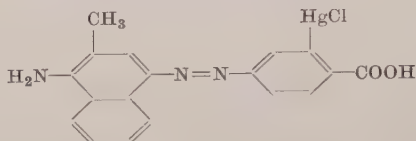
19,08 mg Sbst. 12,66 mg BaSO₄.

Gef. S 9,11 %.

1-Amino-2-methyl-naphthalin-(4-azo-4)-2-chlormercuribenzoessäure (W 125)

Formel (V)

1,1 g mercurierte p-Aminobenzoessäure werden in 0,4 g NaOH und 30 ml Wasser gelöst, und 0,23 g NaNO₂ werden zugegeben. Die Lösung wird unter



Formel (V), W 125.

Kühlung und Umrühren in 3 ml konz. Salzsäure eingetropft. Dann wird mit 0,5 g 2-Methyl-1-naphthylamin in 25 ml Alkohol in Anwesenheit von 2 g Natriumacetat gekuppelt. F. 179° (Zers.).

Bei der Ausführung der Elementaranalysen waren die Herren L. SIHLBOM, B. LUNDQVIST und W. KIRSTEN behilflich, wofür wir unseren herzlichen Dank sagen.

Die Untersuchung wurde ermöglicht durch Unterstützung von *Svenska Nationalföreningen mot tuberkulos* und *A. G. Pharmacia*, Stockholm. Wir möchten dafür an dieser Stelle unseren ergebensten Dank aussprechen.

LITERATUR. (1) H. Willstaedt, *Svensk kem. tid.* 54, 223 (1942). — (2) —, *ibid.* 56, 267 (1944). — (3) H. Willstaedt und Marthe Borggård, *ibid.* 57, 254 (1945). — (4) —, *Arch. Biochem.* 14, 193 (1947). — (5) B. Zetterberg, *Effects on Tubercle Bacilli of Bacteriostatics, Respiration Inhibitors and Bactericides.* Almqvist & Wiksell, Uppsala 1949. — (6) H. Willstaedt, *Svensk kem. tid.* 55, 214 (1943). Zur Bezeichnung vgl. Anschütz, *Ann.* 294, 219 (1896). — (7) J. Madinaveitia, *Anal. Soc. espan. fis. y quim.* 31, 750 (1933).

Tryckt den 6 september 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

On the crystal structure of KUO_2VO_4 (Synthetic anhydrous carnotite)

By INGRID SUNDBERG and LARS GUNNAR SILLÉN

With 3 figures in the text

Next to pitch-blende the two most important uranium minerals at present seem to be two vanadates, the carnotite (in Colorado and Utah) and the tjujamunite (in East Turkestan). The formulae generally ascribed to the minerals are equivalent to $\text{KUO}_2\text{VO}_4(\text{H}_2\text{O})_{1.5}$ for carnotite and $\text{Ca}_{0.5}\text{UO}_2\text{VO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$ for tjujamunite. However, the water content of different specimens seems to vary considerably. Moreover, in contact with an aqueous solution the minerals can to a large extent exchange the K^+ ions for Ca^{2+} or vice versa (HILLEBRAND, 1924); thus it is natural that the analyses vary considerably.

In all specimens with different content of water, and of K^+ , Ca^{2+} , and other cations, the atomic ratio $\text{U}:\text{V}$ seems to be constant $= 1:1$. Thus it seems that there is in these minerals a framework of composition $(\text{UVO}_x)_n$, which remains unchanged. This may be what CANNERI and PESTELLI (1924) had in mind when they suggested that these minerals were derived from "l'acido uranilvanadico $[\text{V}_2\text{O}_6]^{4-}$ ".

We thought it might be of interest to study the atomic structure of this framework by X-ray methods. In order to get well-defined conditions we decided to investigate anhydrous KUO_2VO_4 , and finally worked out a proposed structure for this substance, which was found to be built up of layers of composition $(\text{UO}_2\text{VO}_4)_n$ separated by sheets of K^+ ions. It seems to be closely related to natural carnotite.

It would be a promising task to carry these researches further by comparing the lattice parameters of specimens of carnotite and tjujamunite of different origin, before and after chemical treatment (evaporation of part of the water, or ion exchange).

Previous chemical and mineralogical work on carnotite and tjujamunite is reviewed in the handbooks of GMELIN (1936) and DOELTER (1918).

Preparative work

Ammonium uranate was precipitated with NH_3 from a solution of $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ that had been purified by means of ether extraction. It was filtered, washed, and dried in an oven. The following syntheses were so performed that NH_3 and H_2O evaporated and the uranate

virtually acted as UO_3 ; thus only the U content was of interest. It was determined by igniting the uranate to $1000^\circ C$. The residue, which consisted of U_3O_8 , amounted to 85.0 % of the original weight of the uranate, which thus contained 86.2 % UO_3 .

In addition to preparations of the composition KUO_2VO_4 , we made more than thirty others.

The preparations were made by mixing thoroughly the calculated amounts of ammonium uranate and vanadium pentoxide, either alone or with addition of a calculated amount of K, Na, Ca, or Cs carbonate (all reagents of the purest quality available). The finely grained mixture was put into a Pt crucible, which was placed in an electric furnace and heated very gradually to $1000^\circ C$. When, after about 6 hours, the mixture had attained this temperature, it was usually a transparent melt. In some cases, as for instance in all preparations with Ca, it had only sintered but not melted. After about 15 minutes at $1000^\circ C$ the voltage of the furnace was gradually decreased and switched off after 3 hours.

The samples were taken out after 6–16 hours. They had then an almost metallic lustre and were so hard that they had to be chiselled out of the crucible.

After grinding, the powders were all shades from light yellow over red and brown to black; very often they had a greenish tint.

Powder photographs were taken with PHRAGMÉN focussing cameras. A large number of phases were met with: at least three with only U and V (except for U_3O_8 and V_2O_5 that appeared at the ends of the mixing range); at least four with Na, U, and V; at least one with K, U, and V except KUO_2VO_4 , at least one with Cs, U, and V, and at least four with Ca, U, and V. Most of these phases had a rather complicated structure as witnessed by the large number of lines in the photographs. Phases with powder photographs of a simple type appeared at compositions about $6-8UO_3 \cdot V_2O_5$, about $UO_3 \cdot 2K_3VO_4$, about $2UO_3 \cdot Na_3VO_4$, and about $UO_3 \cdot Ca_3(VO_4)_2$. The latter two phases gave powder photographs that were remarkably similar in appearance, in spite of the wide difference in formulae. It is intended to investigate them later on.

Samples of the composition KUO_2VO_4 also gave comparatively simple powder photographs. When they were later on interpreted, the simplicity was found to be rather delusive; the lines were broadened, and a large number of lines were too weak to be observed.

Repeated attempts were made to prepare single crystals of KUO_2VO_4 by the method given by CANNERI and PESTELLI (1924): K_2CO_3 and V_2O_5 were mixed in the proportions 1:1 (corresponding to the formation of KVO_3), and fused at $1000^\circ C$ in a Pt crucible. To the melt a small amount of ammonium uranate was added; after an hour at $1000^\circ C$ the melt was gradually cooled, and the excess of KVO_3 removed by washing with hot water and finally with cold dilute HNO_3 . In this way we obtained small quadrangular plates, “bellissime tavole quadrangolari”, as described by the Italian authors. (In GMELIN's *Handbuch* this has been erroneously translated by “quadratisch”).

Larger crystals of the same type were obtained in another way. First a mixture of K_2CO_3 , V_2O_5 , and ammonium uranate in the ratio $K:U:V=6:1:1$ was heated to such a temperature that it sintered but did not melt. The product was ground and placed in a Pt crucible with an excess of K_2CO_3 melt

at 1000° C. After one hour at 1000° C the melt, which was at first clear, was allowed to cool very slowly, after which it was washed with hot water and then with cold dilute HNO_3 .

In this way beautiful, yellow, crystal plates 0.5–1.0 mm in diameter were obtained. A number of these were ground, and powder photographs taken. They proved to be identical with those of pure KUO_2VO_4 , from which we concluded that this is in fact the formula of the crystals.

Unit cell

The single crystal photographs indicated that the Laue symmetry is the monoclinic $\text{C}_{2h} = 2/m$. The digonal axis coincides with the diagonal of the acute angles in the plate. Of the other two axes one, which we shall denote by c , is also in the plane of the plate, whereas the a axis is at an angle to it.

Two crystals were set with $[010]$ and $[001]$ as axes of rotation; using $\text{CuK}\alpha$ radiation, both rotation photographs and WEISSENBURG photographs $hk0$, hkl , $h0l$, and $h1l$ were made. Rough values for the unit cell dimensions were obtained from the single crystal photographs; then with the aid of the powder photographs, the following values were calculated:

$$a = 6.57_7 \text{ kX} = 6.59_0 \text{ \AA} \quad \beta = 104.2^\circ$$

$$b = 8.38_6 \text{ kX} = 8.40_3 \text{ \AA}$$

$$c = 10.40_9 \text{ kX} = 10.43_0 \text{ \AA}.$$

The powder photograph lines are listed in Table 1 together with the calculated $\sin^2 \Theta$. Because of a general broadening of the lines, rather few lines were observed with high $\sin^2 \Theta$. The accuracy of the lattice dimensions is about $\pm .01 \text{ \AA}$.

The volume of the unit cell is $556.6 \text{ kX}^3 = 560.0 \text{ \AA}^3$.

The only plausible cell content is 4 formula units KUO_2VO_4 per unit cell, which gives a density of 5.03. For carnotite, the density is given as 4.8.

Comparison with natural carnotite

By the courtesy of Professor FRANS E. WICKMAN we obtained a sample of natural carnotite from Naturita, Colorado, U. S. A., in the form of opaque yellow lumps. The powder photographs of this specimen were remarkably similar to — in fact almost identical with — those of the synthetic KUO_2VO_4 . The main difference was that the hkl with high h were relatively stronger than in the synthetic sample, which may be due to the orientation of or absorption in the thin crystal plates.

The lattice dimensions seemed to be almost the same (a perhaps slightly larger) for the natural sample. However, no attempt was made to measure

Table 1

Powder photographs of KUO_2VO_4 . CrK α radiation

h k l	10 ⁴ sin ² Θ		I obs.	h k l	10 ⁴ sin ² Θ		I obs.
	calc.	obs.			calc.	obs.	
1 2 0	1064	(1067	m+β)	3 1 5	4794	4805	vw
1 1 2	1219	1220	vw	(0 1 6)	(4805)		
2 0 0	1286	1288	st	3 3 3	4824		
0 1 3	1341	1344	w	4 0 2	4859	4870	m
1 1 3	1363	1372	w	(2 2 4)	(4878)		
1 2 2	1378			0 3 5	4880		
2 0 2	1401			3 3 1	4992	4995	vvw
(2 1 1)	(1401)	1410	vw	(1 5 1)	(4994)		
2 1 0	1472	1472	vw	3 1 3	5130	5130	m
2 1 1	1799	1803	w	4 0 0	5142		
0 3 1	1800			1 5 2	5280	5290	m—
1 1 3	1961	1958	vw	4 1 3	5289		
2 2 0	2029	2036	w	2 2 6	5454	5448	vvw
2 1 3	2030			4 2 2	5602		
2 2 2	2144			4 0 4	5603	5604	m—
(1 1 4)	(2162)	2152	vw	4 1 1	5854		
0 3 2	2185	2189	vw	3 4 0	5866		m
(2 0 2)	(2197)			4 2 0	5885	5872	
0 3 3	2827	2827	w	3 3 5	6280	m	
(2 3 1)	2887	(2895	st+β)	1 2 6	6280		6276
3 0 0	2893			1 5 3	6420	vw	
(3 1 1)	2908			4 1 5	6546		6550
1 1 5	3217	3214	m—	3 3 3	6616	w	
2 1 3	3224			1 5 4	6621		6622
1 4 0	3294	(3300	vw+β)	4 3 3	6775	w	
3 1 3	3338	3342	w	3 2 4	6883	(6874	w+β)
0 1 5	3394	3394	vw	1 5 5	7676	7676	vw
0 4 2	3486	3500	m	4 1 3	7677		
3 1 1	3506			5 1 3	7883	7884	vvw
1 2 4	3515			4 3 5	8032		
2 3 3	3516	3556	w	5 2 2	8296	8305	w
3 2 2	3552			(2 3 6)	(8771)		
3 2 0	3636	3636	m	5 2 0	8778	8778	w
2 1 5	3685	3682	vw	(4 0 4)	(8787)		
3 0 2	4003	3995	w	0 2 8	8954	8959	vw
1 4 2	4006			5 3 2	9225		
3 1 2	4189	4183	vw	2 5 6	9356	9364	vvw
1 1 5	4213	4221	vvw	5 3 3	9369		
2 3 4	4215			3 6 2	9498		
2 4 0	4259	(4260	w+β)	4 5 2	9504	9514	vvw
0 0 6	4619	(4600	vw+β)	(1 1 8)	(9514)		
1 3 5	4703	4705	m—	(4 5 1)	(9517)		
2 3 3	4710						
2 0 6	4711						

them accurately, since the figures would be rather meaningless without a complete analysis.

At any rate it seems to be established that the structure of carnotite is very closely related to that of synthetic KUO_2VO_4 .

Space group

In the Weissenberg and powder photographs the only systematic extinctions observed were that $h0l$ with l odd, and $0k0$ with k odd, were absent, which is characteristic of space group C_{2h}^5 . Since the intensities could be explained assuming atomic positions in C_{2h}^5 , there was no reason to descend to a lower symmetry.

In the unit cell there are 4 U, 4 K, 4 V, and 24 O atoms. Space group C_{2h}^5 has the general 4-fold point position

$$4(e): \pm (xyz; x, \frac{1}{2} - y, \frac{1}{2} + z)$$

and moreover four special 2-fold positions:

$$(000, 0\frac{1}{2}\frac{1}{2}) + : 2(a) 000, 2(b) \frac{1}{2}00, 2(c) 00\frac{1}{2}, 2(d) \frac{1}{2}0\frac{1}{2}.$$

Positions of the U atoms

The U atoms must give the chief contribution to the intensities. From the intensities of the $h0l$ it was obvious that U could not occupy two twofold point positions and must thus be situated in 4(e).

It was only necessary to consider parameters in the range $0 \leq x_U \leq \frac{1}{2}$, $0 \leq y_U \leq \frac{1}{4}$, and $0 \leq z_U \leq \frac{1}{4}$; a triplet (xyz) outside this range can always be transformed to one inside it by symmetry operations or change of origin.

Between the U atoms in 4(e) the following distances can be expected to appear as maxima in the PATERSON function, and its projections along the y and z axes:

$P(uvw)$	$P(upw)$	$P(uvp)$
$2x_U, 2y_U, 2z_U \quad (1) \quad \left. \begin{array}{l} \\ \end{array} \right\}$	$2x_U, 2z_U \quad (2)$	$\left\{ \begin{array}{l} 2x_U, 2y_U \quad (1) \\ 2x_U, 2\bar{y}_U \quad (1) \end{array} \right.$
$2x_U, 2\bar{y}_U, 2z_U \quad (1) \quad \left. \begin{array}{l} \\ \end{array} \right\}$		
$2x_U, \frac{1}{2}, \frac{1}{2} + 2z_U \quad (2)$	$2x_U, \frac{1}{2} + 2z_U \quad (2)$	$2x_U, \frac{1}{2} \quad (2)$
$0, \frac{1}{2} - 2y_U, \frac{1}{2} \quad (2)$	$0, \frac{1}{2} \quad (2)$	$0, \frac{1}{2} - 2y_U \quad (2)$
$0, 0, 0 \quad (2)$	$0, 0 \quad (2)$	$0, 0 \quad (2)$

The weights of the maxima are added within brackets.

From (roughly estimated) intensities of the $hk0$ we computed the cuts $P(0vp)$ and $P(u\frac{1}{2}p)$. In the latter cut we found only one huge maximum at $\approx (0\frac{1}{2}p)$. Since this maximum should correspond to $(2x_U, \frac{1}{2}, p)$, x_U is close

to either 0, or $\frac{1}{2}$. In $P(0\ v\ p)$ we found maxima at $v = 0$ and $\frac{1}{2}$ (the latter only slightly lower) from which we concluded that y_U is either close to 0 or close to $\frac{1}{4}$. (See the list of interatomic distances above).

Now the intensities of the $h0l$ were used for calculating $P(0\ p\ w)$ which, of course, proved to give high maxima at $w = 0$, and $\frac{1}{2}$. In addition, lower maxima were found at $w = .14, .36$ etc. Thus z_U is either close to 0 or $\frac{1}{2}$, or close to 0.07 or 0.18. The first alternative was ruled out by the fact that in the WEISSENBURG photograph 004 is weaker than both 002 and 006.

Thus the PATTERSON cuts indicated:

$$x_U \approx .00 \text{ or } \approx .50; \quad y_U \approx .00 \text{ or } \approx .25; \quad z_U \approx .07 \text{ or } \approx .18.$$

With the aid of the intensities of $h0l$, more accurate values for x_U and z_U were sought for. It was found that the main trend of the intensities — disregarding smaller deviations that could be ascribed to the influence of the lighter atoms — could be explained either by $x_U = .014$ $z_U = .066$, or by $x_U = -.014$ (or .486, which is equivalent), $z_U = .184$ (inaccuracy $\pm .002$).

By means of the $h1l$ we could exclude $y_U = .25$, which would have made $h1l$ with even l much stronger than those with odd l , whereas the opposite was found. Moreover, good agreement for the $h1l$ was obtained with $(x_U\ y_U\ z_U) = (-.014; 0; .184)$, but not with $(.014; 0; .066)$.

The intensities of the hkl proved more sensitive to small changes in y_U than those of the $hk0$. We found good agreement for the $hk0$ and hkl with $y_U = .026 \pm .003$.

Thus we arrived at the following preliminary set of U coordinates:

$$x_U = -.014 \pm .002; \quad y_U = .026 \pm .003; \quad z_U = .184 \pm .002.$$

The positions of the K and V atoms

With these U coordinates, the intensities of all strong and medium reflections came out with the right magnitude. Among the weaker spots, however, there were a number of breaks in the general trend of the intensities, which must be ascribed to the contribution δF from the lighter atoms, especially K and V, to the structure factor F . For some of these spots, both the sign and the approximate magnitude of δF could be estimated, for others where the contribution from U was small it could only be said that $|F|$ must not be smaller than a certain value.

For instance, we estimated δF (putting $4f_U = 100$) for the following $hk0$ reflections: 430 (-10), 450 ($+10$), 460 (-15), 630 (-10), 650 ($+10$), 710 (-30).

Moreover δF must increase the $|F|$ for 150 and 510 to a value not less than 20.

The structure factor for $hk0$ can be written as

$$\begin{aligned} \sin 2\pi hx \sin 2\pi ky & \quad \text{for } k = \text{odd} \\ \cos 2\pi hx \cos 2\pi ky & \quad \text{for } k = \text{even.} \end{aligned}$$

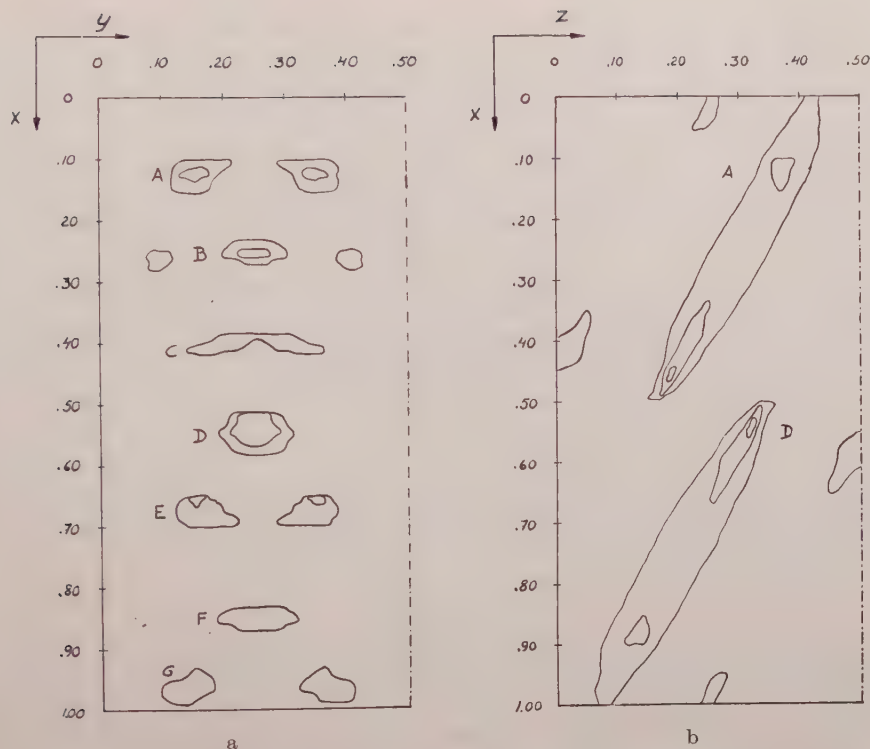


Fig. 1. Partial Fourier sums, using the contributions from the K and V atoms. 1 a) (left) $\delta \rho(x y p)$ according to (1). Weights of maxima A 45, B 45, C 37, D 74, E 43, F 37, G 45. 1 b) (right) $\delta \rho(x p z)$ according to (2). Weights of maxima A 52, D 93.

Then the partial Fourier sum:

$$\delta \rho(x y p) = \sum \sum (\delta F_{h k_{\text{odd}} 0} \sin 2 \pi h x \sin 2 \pi k y + \delta F_{h k_{\text{even}} 0} \cos 2 \pi h x \cos 2 \pi k y) \quad (1)$$

can be expected to give maxima in such points as will give contributions to F of the right signs and magnitudes, thus to possible atomic positions for K or V. Since the origin is now fixed by the U coordinates it is necessary to consider the range $0 \leq x \leq 1$, $0 \leq y \leq \frac{1}{4}$, $0 \leq z \leq 1$ for K and V.

The function (1) was calculated using the δF values given above. In Fig. 1 a it is plotted for $0 \leq x \leq 1$ and $0 \leq y \leq \frac{1}{2}$. It is symmetrical around $y = \frac{1}{4}$, and must contain the points (x_v, y_v) , $(x_v, \frac{1}{2} - y_v)$, (x_k, y_k) , and $(x_k, \frac{1}{2} - y_k)$.

The highest maxima for $y \leq \frac{1}{4}$ were A(.12 .17), B(.25 .25), C(.40 .19), D(.53 .25), E(.66 .15), F(.84 .20), and G(.97 .11), which thus correspond to possible point positions for K and V.

In the following the scattering powers of K and V were assumed to be practically equal, and = 0.20 times that of U. By trial it was found that

the only combinations of two of the points A–G that gave a sufficient intensity for 510 and 150 were A + C, A + D, B + E, and C + D. For the same reason all combinations of one of these points with two twofold point positions (that would not contribute to reflexions with odd k) could be ruled out.

Furthermore A + C and C + D would give much too high F for 610; with 630 and 650 also serious discrepancies arose. Of the two remaining combinations (A + D) and (B + E), the former gave a much better set of calculated intensities.

We now turned to the $h0l$, for which we could estimate the following δF : 106 (– 10), 202 (+ 20), 204 (– 10), 302 (– 15), 304 (+ 20), 306 (– 20), 404 (– 7), and 504 (+ 15.) (It so happened that we could not determine the δF for any $h0l$ with certainty.) The corresponding function

$$\delta \rho(xpz) = \Sigma \Sigma F_{h0l} \cos 2\pi(hx + lz) \quad (2)$$

is plotted in Fig. 1 b for $0 \leq x \leq 1$ and $0 \leq z \leq \frac{1}{2}$. It should contain maxima corresponding to one point out of each of the following couples:

$$\pm (x_V, z_V), \pm (x_V, \frac{1}{2} + z_V), \pm (x_K, z_K), \text{ and } \pm (x_K, \frac{1}{2} + z_K).$$

Actually, as seen from Fig. 1 b, the function, which is symmetrical around $(\frac{1}{2}, \frac{1}{4})$, gives in this range two long ridges with distinct peaks at (.12 .37), (.47 .16), (.53 .34), and (.88 .13). The x values of these peaks do not agree with those of the combination (B + E) mentioned above; for this reason (B + E) was now finally excluded. However, the agreement with the x values of (A + D) is remarkable.

There still remained an ambiguity in the z values since the maxima in Fig. 1 a and 1 b could be explained by a combination of

$$(A) \quad x \approx .12, \quad y \approx .17, \quad z \approx .37 \text{ or } .87$$

$$(D) \quad x \approx .53, \quad y \approx .25, \quad z \approx .34 \text{ or } .84.$$

However, from the intensities of the hkl and hll it became clear that agreement was obtained only with $z_A \approx .37$; $z_D \approx .34$ and $\approx .84$ are identical as long as y_D exactly = .25.

We now tried varying the parameters for U, K and V so as to obtain the best agreement between calculated and observed intensities. As previously, we assumed the scattering factors $f_K = f_V = 0.20 f_U$. For U there was no reason to change the parameters, whereas the agreement was improved by small shifts in some of the other parameters.

The final set chosen for the metal atoms was C_{2h}^5 :

$$4U \text{ in } 4(e), \pm (xyz; x, \frac{1}{2} - y, \frac{1}{2} + z),$$

$$x = -.014 \pm .002, \quad y = .026 \pm .003, \quad z = .184 \pm .002$$

4 K and 4 V in

$$\text{A) } 4(e), \quad x = .11, \quad y = .17, \quad z = .41$$

$$\text{D) } 4(e), \quad x = .54, \quad y = .25, \quad z = .35.$$

The accuracy of the K and V parameters was estimated to $\pm 0.01 - 0.02$.

Tentative structure

It remained to choose positions for the oxygen atoms and to decide which of the "A" and "D" atoms is K and which is V.

It seemed almost certain that every uranium atom has two oxygen atoms for itself, forming with them a linear uranyl ion UO_2^{2+} . There is, as far as we know, no crystal structure known, that contains U^{VI} and O, and definitely does not contain UO_2^{2-} groups. For the "uranates" BaUO_4 (SAMSON and SILLÉN 1947), CaUO_4 and SrUO_4 (ZACHARIASEN 1948), the existence of uranyl groups has been proved with great certainty, and such groups have also been assumed and found to give plausible structures for autunite (BEINTEMA 1938) and the acetatouranates (FANKUCHEN, 1935, 1936).

As for V, it seems probable that it forms almost regular VO_4 tetrahedra, since this configuration has been met with in V_2O_5 (KETELAAR 1936, corners shared) and CrVO_4 (BRANDT 1943), and is moreover indicated in $\text{Na}_3\text{VO}_4(\text{H}_2\text{O})_{12}$ and $\text{Pb}_5(\text{VO}_4)_3\text{Cl}$ (WELLS 1945) by their isomorphy with the corresponding phosphates and arsenates.

Since the number of oxygen atoms is exactly sufficient for this, it seems probable that the lattice is built up of UO_2^{2+} , VO_4^{3-} , and K^+ as separate units. The following interatomic distances were assumed, based on earlier structure determinations

U — O in UO_2^{2+}	1.9 ₀ Å
U — O outside UO_2^{2+}	≥ 1.9 Å
V — O in VO_4^{3-}	1.7 ₀ Å
K — O	≥ 2.6 Å
O — O	≥ 2.5 Å.

With the atomic positions derived above, the uranium atoms are seen to form layers parallel to the yz plane at $x=0$, $x=1$ etc. The "A" atoms at $x = \pm .11$ are interwoven with these layers, whereas the "D" atoms at $x = .54$ form separate sheets between the A — U sheets.

If the "D" atoms were assumed to be V, and the "A" atoms to be K we could not find any oxygen positions such that the lattice was sufficiently stabilized by mutual contracts O — O, O — U, and O — K. On the other hand as we shall see, by assuming **A = V**, **D = K** a reasonable structure could be derived.

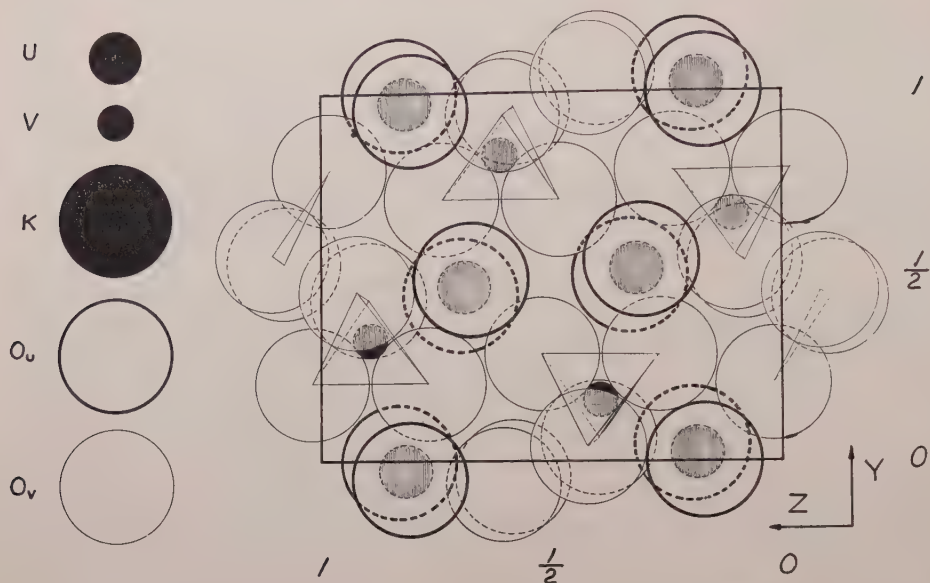


Fig. 2. Projection of a $(UO_2VO_4)_n$ layer on the yz plane. The linear UO_2^{++} groups are seen almost in the direction of their length. The centres of the oxygen atoms of each VO_4^{3-} groups have been connected with lines; they form almost regular tetrahedra. The K^+ ions have not been drawn for simplicity's sake. The projection is perpendicular (thus not parallel to the x axis, which is at an angle of 104.2° to the yz plane).

In order to find the positions of the four oxygen atoms around a V atom, the following construction was used. The centres of the oxygen atoms were assumed to form an almost regular tetrahedron and to be situated on a sphere of radius $1.70 \text{ \AA}$ around the V atom. This sphere was represented by a wooden ball. Now it is very improbable that the oxygen centres are within spheres of radius $1.90 \text{ \AA}$ around the U atoms, or within spheres of radius $2.6 \text{ \AA}$ around the K atoms. Moreover, the distance from an O to a symmetry centre of the structure cannot be less than $1.25 \text{ \AA}$, since otherwise it comes too close to other oxygen atoms. — These three types of conditions gave rise to circular "forbidden areas" which were marked out on our ball.

In the area still left free we could accommodate tolerably regular tetrahedra in two ways only, with the approximate parameters (± 0.03)

	x	y	z		x	y	z	
I	.30	.29	.49	II	.31	.04	.47	(VO ₄ oxygen around V in (.11 .17 .41))
	.23	.01	.45		.11	.29	.28	
	.04	.14	.30		.11	.29	.54	
	.11	.18	.54		.10	.06	.38	

Similarly, the centres of the uranyl oxygens should be on the surface of a sphere of radius $1.90 \text{ \AA}$. On this sphere forbidden areas could be constructed,

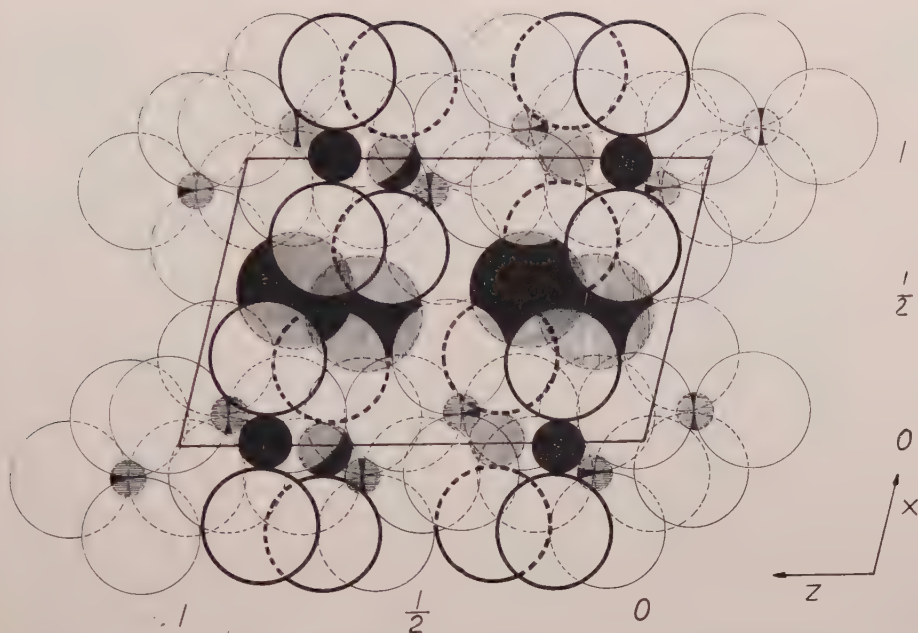


Fig. 3. Projection of the structure of KUO_2VO_4 on the xz plane. The $(\text{UO}_2\text{VO}_4)_n$ layers are seen to be separated sharply by the plane $x = \frac{1}{2}$ (horizontal in this Fig.). The K^+ ions are inserted close to this dividing plane.

representing a too close approach to K atoms or to oxygen atoms from the VO_4 groups. With the positions I for the VO_4 groups, we could not obtain linear UO_2 groups at all. With II the forbidden circles left free a small area around:

x	y	z	
.31	.05	.15	} UO_2 oxygens around U in $(-.01_4 .02_6 .18_4)$
.28	.00 ₅	.22	

With the oxygen positions arrived at, the structure consists of sheets of composition $(\text{UO}_2\text{VO}_4)_n$ interfoliated with sheets of K^+ ions. In Fig. 2 such a sheet is viewed in a direction perpendicular to the yz plane. Every VO_4 group shares three oxygens with U atoms so that a sheet is held together by V—O—U bridges in all directions. There is a certain arbitrariness in the final choice of the oxygen parameters, since reasonable interatomic distances would be obtained even if some of the parameters were shifted by a few hundredths.

When the contributions of the oxygen atoms to the structure factors were now included, the agreement between calculated and observed intensities was still so good that we did not try to change the K and V parameters.

Table 2

Calculated and observed intensities for $hk0$ in WEISSENBERG photographs of KUO_2VO_4 . CuK α radiation

h	$h00$	$h10$	$h20$	$h30$	$h40$	$h50$	$h60$	$h70$	$h80$
0	—	—	58 st+	0 —	110 st	0 —	35 m	0 —	32 w
1	—	21 vw	100 st+	0 vw	37 st	4 w	82 m	2 —	0 w
2	116 st+	12 vw	37 st	9 vw	81 st	4 vw	18 w	1 —	19 vw
3	69 st	3 vw	130 m	1 —	43 m	21 vw	34 w	0 —	3 w—
4	64 st	5 vw	90 st	9 vw	76 w	1 —	4 —	15 —	23 vw
5	34 m	10 w	110 m	1 vw	45 m	20 w	10 w	7 w	18 w
6	51 m	1 —	76 m	18 w	47 m	1 vw	11 w+	70 m	
7	76 m	28 w	51 m	0 vw	60 m	23 w+			
8	56 m	0 —	48 m						

The thin line indicates the border-line between reflected and transmitted rays.

Table 3

Calculated and observed intensities for $h0l$ in WEISSENBERG photographs of KUO_2VO_4 . CuK α radiation

h	$h0\bar{1}0$	$h0\bar{8}$	$h0\bar{6}$	$h0\bar{4}$	$h0\bar{2}$	$h00$	$h02$	$h04$	$h06$	$h08$	$h010$	$h012$
0		132 m	169 m	12 w	50 st		50 st	12 w	69 m	132 m	41 —	41 —
1	65 vw	54 m	18 m	2 w	67 m	130 st	10 m	1 vw	25 w	100 w	39 —	
2	74 vw	84 m	64 st	0 vw	116 w	116 st	15 w	11 w	85 w	148 w		
3	47 vw	31 w	31 w	1 vw	43 vw	69 st	22 w+	0 vw	65 w—	146 w—		
4	60 vw	111 w	65 w	11 —	145 st	64 st	15 w	18 w+	86 w+	81 vw		
5	24 vw	40 vw	26 vw	11 —	70 m	34 w+	28 vw	11 w	131 m	64 w+		
6	76 w+	175 w+	23 vw	68 w	96 m	51 m	1 —	65 m	117 st			
7	43 m	162 m	13 ≤w	20 vw	42 m	76 m	25 —	43 m				
8			1 ≤w	59 m+	81 st	56 st						

The reflections $70\bar{6}$ and $80\bar{6}$ happened to coincide with $h1l$ reflections (the crystal was slightly bent so that the rotation photograph spots with high h were elongated).

Final proposed structure

We thus propose the following structure for KUO_2VO_4 :

$$\text{C}_{2h}^5 - P 2/c \quad a = 6.59_0 \text{ \AA}, \quad b = 8.40_3 \text{ \AA}, \quad c = 10.43_0 \text{ \AA}, \quad \beta = 104.2^\circ$$

4 KUO_2VO_4 per unit cell, all atoms in 4 (e), $\pm (xyz; x, \frac{1}{2} - y, \frac{1}{2} + z)$

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>
U	.986	.026	.184
V	.11	.17	.41
K	.54	.25	.33
O _{U1}	.69	.05	.15
O _{U2}	.28	.005	.22
O _{V1}	.31	.04	.47
O _{V2}	.11	.21	.28
O _{V3}	.11	.21	.54
O _{V4}	.90	.06	.38

The accuracy is estimated to $\pm .002 - .003$ for the U atoms, $\pm .01 - .02$ for the K and V atoms, and $\pm .02 - .04$ for the oxygen atoms.

The calculated and observed intensities for the $h k 0$ and $h 0 l$ of the WEISSENBURG photographs are listed in Tables 2 and 3. The thin lines separate the regions of transmission and reflection (cf WELLS 1937, BUEGER 1938); since the spots in the former region are generally weakened by absorption, intensities from different regions cannot be compared directly. The I_{calc} are given as $\left(\frac{10 F}{4 f_U}\right)^2$; we have as previously assumed $f_K = 0.20 f_U$, $f_V = 0.20 f_U$; the ratio

f_O/f_U , which varies considerably with $\frac{\sin \Theta}{\lambda}$, has been computed using the values given in the International Tables.

The interatomic distances in $\text{\AA}$ would be:

Within a uranyl group: $\text{U} - 2 \text{O}_U \quad 1.9_0$

Within a vanadate group (which seems to be slightly deformed):

V — 4 O _V	$1.7_0 \pm .03$	O _{V2} — O _{V3}	2.8_2
O _{V1} — O _{V2}	3.0_2	O _{V2} — O _{V4}	2.7_7
O _{V1} — O _{V3}	2.6_6	O _{V3} — O _{V4}	2.7_0
O _{V1} — O _{V4}	2.6_5		

Between UO_2 and VO_4 groups of the same sheet:

$U - 2 O_{V2}$	2.1 ₇ , 2.4 ₈	$O_{V1} - O_{V4}$	2.5 ₀
$U - O_{V3}$	2.4 ₁	$O_{V2} - O_{V3}$	2.5 ₁
$U - O_{V4}$	2.2 ₈	$O_{V4} - O_{V4}$	2.7 ₆
$O_{U1} - O_{V2}$	2.6 ₀	$O_{U2} - O_{V1}$	2.6 ₀
$O_{U1} - O_{V4}$	2.5 ₀	$O_{U2} - O_{V3}$	2.6 ₃

From K^+ ions to oxygen atoms in the two adjacent sheets:

$K - O_{U1}$	2.8 ₅	$K - O_{V1}$	2.9 ₃
$K - O_{U1}$	2.9 ₈	$K - O_{V2}$	2.7 ₈
$K - O_{U2}$	2.6 ₇	$K - O_{V2}$	2.8 ₀
$K - O_{U2}$	2.5 ₆		

Between different sheets the only $O - O$ contacts seem to be:

$O_{U1} - O_{U2}$	2.6 ₂
-------------------	------------------

It should be understood that these interatomic distances are uncertain by .1 — .2 Å, depending on the inaccuracy of the oxygen parameters. It is possible that slightly "better" atomic parameters might be obtained by a series of successive approximations based upon the intensities of the X-ray reflections and assuming certain "normal" interatomic distances. However, because of the large number of parameters involved we doubted that the gain in real accuracy would be in proportion to the work involved. In the $(UO_2VO_4)_n$ sheets which are crowded with highly charged ions it is by no means certain that the interatomic distances are all "normal".

At any rate, the approximate atomic parameters obtained ($\pm .1 - .2$ Å) suffice for giving a good picture of the principles of the structure.

In Fig. 2 and Fig. 3 the structure is shown projected on the yz and xz planes. It consists of sheets of composition $(UO_2VO_4)_n$, separated by layers of K^+ along (011). With this structure it is clear why the crystals have a preferential cleavage along (011); it is also possible to imagine how — in carnotite and related minerals — the sheets can accommodate between them other ions than K^+ , and variable quantities of water.

Our thanks are due to Mr SVEN SAHLQVIST and to Mr STEN SAMSON for valuable aid in the practical work.

We are indebted to Atomkommittén for a grant.

SUMMARY

A crystal structure has been worked out for a synthetic compound KUO_2VO_4 , which seems to be very closely related to natural carnotite. The positions of the U, K, and V atoms have been determined from the intensities, whereas reasonable oxygen positions have been derived from considerations of the interatomic distances and the coherency of the lattice.

The atomic positions are listed on p. 349 and the interatomic distances ($\pm .1 - .2 \text{ \AA}$) on p. 349-350. The structure is shown in two different projections in Fig. 2 and Fig. 3. It consists of sheets of $(\text{UO}_2\text{VO}_4)_n$, separated by K^+ layers.

The powder photographs of synthetic KUO_2VO_4 and of a sample of the mineral carnotite were almost identical. Thus it seems probable that the natural U-V minerals contain similar $(\text{UO}_2\text{VO}_4)_n$ sheets, but that the K^+ ions may be partly replaced by other ions, and that a variable amount of water enters the lattice. It would be an interesting task to study in detail the structure of these minerals — especially carnotite and tjujamunite — and the products obtained from them by ion exchange and dehydration.

LITERATURE. Beintema, J. (1938), *RecTrav* 57, 155. — Brandt, K. (1943), *Arkiv Kemi*, 17 A, nr 6. — Buerger, M. J. (1938), *ZKrist* 99, 189. — Canneri, G. and Pestelli, V. (1924), *Gazz* 54, 641. — Doelter, C. (1918), *Handbuch der Mineralchemie*, III: 1, 844-849. — Fankuchen, I. (1935), *ZKrist* 91, 473. — — (1936), *ZKrist* 94, 212. — Gmelins *Handbuch der anorganischen Chemie* (1936), 8 Aufl., 55 U, 34-37, 241. — Hillebrand, W. F. (1924), *AmJSci* (5) 8, 201. — Ketelaar, J. A. A. (1936), *ZKrist* 95, 9. — Samson, S. and Sillén, L. G. (1947), *ArkivKemi* 25 A, no 21. — Wells, A. F. (1937), *ZKrist* 96, 451. — — (1945), *Structural Inorganic Chemistry*, Oxford, p. 421. — Zachariasen, W. H. (1948), *ActaCryst* 1, 201.

Tryckt den 12 oktober 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

On the structure of complex compounds of bivalent molybdenum. III

X-ray analysis of the structure of the chloroacid in alcoholic solution

By CYRILL BROSSET

With 4 figures in the text

The framing of the problem

Some years ago I reported in this journal on X-ray crystallographical investigations of two complex compounds with bivalent molybdenum (BROSSET, 1945, 1946). These investigations proved the existence of a type of complex compound containing a central group with the formula $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$. In this group the molybdenum atoms are placed at the corners of an octahedron. As the latter has an edge of only about 2,6 kX, the distance between the molybdenum atoms within this group is a little shorter than in molybdenum metal, which indicates the presence of strong bonds. For groups of this type I have proposed in another paper (BROSSET, 1947) the term staphylo-nuclear groups.

The octahedral staphylo-nucleus in the group $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ is surrounded by eight chlorine atoms in a cubic configuration, as is seen from Fig. 1 a. Such a distribution of atoms implies the presence of six equivalent directions along which the screening effect of the molybdenum atoms by the chlorine atoms is minimum, i.e. the six normals to the cube faces starting from the center of the group. This may be the reason why the group $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ can function as a central group in a series of complex compounds, having the capacity of binding six ligands such as negative ions or polar molecules with weak bonds along these directions. Established groupings of ligands are illustrated in Figs 1 b and 1 c, which demonstrate the structural elements of the compounds $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2\}12 \text{ H}_2\text{O}$ and $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{\text{Cl}_4(\text{H}_2\text{O})_2\}6 \text{ H}_2\text{O}$. Finally, in Fig. 1 d we have the probable configuration of the structural element of the chloroacid with the empirical formula $\text{HMo}_3\text{Cl}_7 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$.

As the chloroacid is one of the most important compounds in this category, it seems reasonable to say some words about its chemical properties. The molybdenum chloroacid crystallizes in monoclinic yellow needles from a saturated solution of MoCl_2 in aqueous HCl 1:1. The crystals are instable in air but do not undergo decomposition if kept over concentrated HCl . The chloroacid is very soluble in ethyl alcohol and these solutions are stable. From

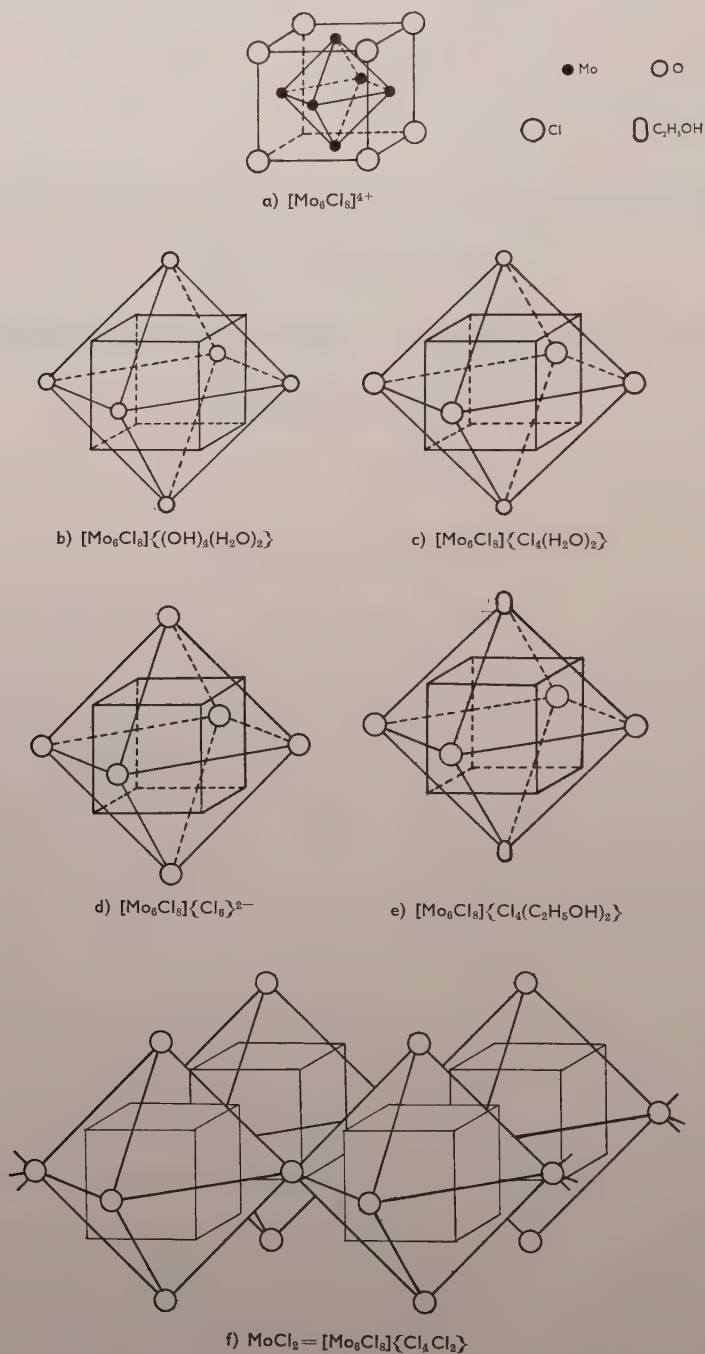


Fig. 1.

these solutions 3.7 of their total chlorine content is precipitated by addition of alcoholic silver nitrate. This behaviour is in good agreement with the structure proposed in Fig. 1 d. Of the fourteen chlorine atoms present, six are weakly bound as ligands and can consequently be precipitated by silver ions. On the other hand, this is not possible in the case of the remaining eight which are strongly bound in the central group.

The chloroacid is soluble in water too. However, these solutions are not stable but soon decompose with precipitation of insoluble products. This process of hydrolysis has been studied by LINDNER and co-workers (1923). They have performed the hydrolysis of the chloroacid under different conditions (different concentrations and temperatures), filtered off the precipitates and determined chlorine in the filtrates. From their data, I have calculated how many chlorine atoms of the fourteen in question have been substituted for. The results of the various attempts are as follows: 2.38 2.54 4.04 4.76 4.81 5.84 5.92.

This series shows that the substitution of water for chlorine proceeds in a consecutive manner, depending upon the conditions, and with six replaced chlorine atoms as upper limit. The aquo ions formed in this way are acids that protolyse to a certain degree. Among the groups obtained by these reactions, the electro-neutral ones seem to be very little soluble in water and weak acids. Consequently it might be assumed that in a system containing H_2O , H^+ and Cl^- the radical $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ functions as a central group forming complex ions or molecules with the general formula



where $x + y + z = 6$. The relative activities of the different complexes are ruled by those of the hydrogen and chlorine ions.

The precipitates obtained by the reactions of the chloroacid with water are generally amorphous and badly defined. However, under special conditions well established compounds can nevertheless be formed. The formulas of such compounds hitherto investigated and of the chloroacid itself are given below:

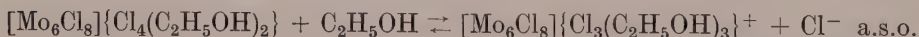
1. $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{\text{Cl}_6\}\text{H}_2\text{aq}$: cryst., analysed a.o. by LINDNER et al. (l.c.) and BROSSET, see below.
2. $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{\text{Cl}_4(\text{H}_2\text{O})_2\}\text{aq}$: cryst., analysed by LINDNER et al. (l.c.), structure established (BROSSET l.c.).
3. $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{\text{Cl}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2\}\text{aq}$: amorphous, analysed by LINDNER et al. (l.c.).
4. $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2\}\text{aq}$: amorphous or cryst., analysed by LINDNER et al. (l.c.) and BROSSET (l.c.), structure established (BROSSET, l.c.).

Nothing mentioned hitherto contradicts the existence of the stable radical $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ in solution and in the solid state of the compounds in question. However, MUTHMANN and NAGEL (1898) and LINDNER and co-workers (l.c.) have reported some cryoscopic and ebullioscopic measurements, which — according to their interpretation — seem to agree with their assumption that bivalent molybdenum in the solution of its complex halogenides is present in

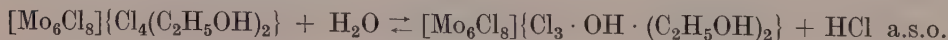
the form of radicals $[\text{Mo}_3\text{Cl}_4]^{2+}$. There is every reason to look into these investigations.

Following BLOMSTRAND's method (1859), MUTHMANN and NAGEL (l.c.) prepared the yellow compound with the empirical formula MoCl_2 . This compound they dissolved in absolute alcohol and measured the elevation of the boiling point. From these measurements they obtained the values 526 and 513 (two measurements) for the molecular weight of the compound. As the formula Mo_3Cl_6 corresponds to the molecular weight 501, they have concluded that BLOMSTRAND's dichloride is present in its alcoholic solution as an undissociated chloride $[\text{Mo}_3\text{Cl}_4]\text{Cl}_2$ of the radical $[\text{Mo}_3\text{Cl}_4]^{2+}$. The state of dissociation they have checked by means of measurements of the electrical conductivity. On this point they report: "Die Lösung leitete die Elektrizität nicht merklich, sodass Dissociation ausgeschlossen war". This is, however, contradictory to the well-known fact that one third of the chlorine bound in the dichloride is at once precipitated, when a sufficient amount of alcoholic solution of silver nitrate is added to the alcoholic solution of dichloride. According to my measurements, the spec. conductivity of a solution of MoCl_2 in alcohol (3.6 g in 100 ml ethyl alcohol 99.9 %) at 25° C is about $5 \cdot 10^{-4} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$. Thus dissociation is not out of the question in this system.

Further, LINDNER and co-workers (l.c.) have shown that MoCl_2 is incongruently soluble in alcohol. Evaporating such a solution results in the crystallization of a very well defined, yellow coloured and stable compound with the empirical formula $\text{Mo}_3\text{Cl}_6 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. It seems probable that the structure element of this compound may possess the configuration demonstrated in Fig. 1 e and that its formula may be $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{\text{Cl}_4(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2\}$. Consequently, when dichloride is dissolved in alcohol its pattern is distorted in an irreversible manner. This fact and the great stability of MoCl_2 against oxydation seem to indicate that it is also built up of $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ groups, which groups are surrounded by six chlorine atoms. Such an arrangement will, for example, appear if the dichloride should possess a layer lattice, with layers of the type demonstrated in Fig. 1 f. Attacked by alcohol molecules such a layer may be decomposed forming the groups $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{\text{Cl}_4(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2\}$, the coordination number (6) of the central group being unchanged. As mentioned, above, the four chlorine ligands are here rather easily exchanged, so that, the following equilibrium may be attained in an alcoholic solution:



On the other hand, in the presence of small amounts of water the main reaction may be the following:



All this proves that MoCl_2 and alcohol (and water even in minimal amounts) do react with each other, making it difficult to deduce from the boiling point of the alcoholic solutions the molecular weights of the complexes containing molybdenum.

The second of the investigations in question was performed by LINDNER and co-workers (l.c.). They prepared a compound to which they attributed

the formula $C_5H_5N \cdot H(Mo_3Cl_7 \cdot H_2O)$, which corresponds to the molecular weight 634. From freezing-point measurements with nitrobenzene as solvent, they obtained for the molecular weight of this compound: 678, 700 and 773 (three measurements). They said nothing about the recrystallization of the compound from nitrobenzene. The unsatisfactory agreement between the calculated values and the observed ones is commented on as follows: "Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Gefrierpunktserniedrigungen wegen des hohen Molekulargewichtes sehr klein sind und ausserdem bei der relativ hohen Dielektrizitätskonstanten des Nitrobenzols (36.45) Komplikationen infolge Dissoziationserscheinungen eintreten können". However, the complications indicated would result in values, too low in comparison with the calculated ones, but the values of the molecular weight they obtained from their measurements are up to 24 % too high, as compared with the proposed formula.

Summing up, it may be said that solutions of halogen compounds of bivalent molybdenum have many properties indicating the conservation in solution of the group $[Mo_6Cl_8]^{4-}$ present in the solid state. But a direct proof is lacking. The only investigations in this field are interpreted in favour of the group $[Mo_3Cl_4]^{2+}$, but these investigations are not convincing. Hence it was of interest to investigate the constitution of halogenides of bivalent molybdenum in solutions by a method that might be better suited for this problem.

Among all the methods considered, the one making use of X-ray diffraction in liquids for determining their structures seemed to lend itself even to the determination of the structure of a solute. Specially in the modified form used by FINBAK and his collaborators in Oslo, this method of X-ray diffraction seemed promising for the purpose in question and worth trying. In the following this attempt is described.

General principles of the method

FINBAK and his collaborators developed a valuable method for determining the radial distribution functions of liquids (FINBAK, 1943). They used this method for structure determinations, especially concerning pure liquids and concentrated solutions. But it seemed very probable that this field of research could, under special conditions, be enlarged to include the determination of the structure of some solute in a rather dilute solution.

It is well known that useful distribution functions can be calculated from X-ray photographs taken from solutions that do not absorb the radiation used too much. The experience gained by FINBAK's school indicates that a solution is suited for such measurements if its absorption properties fulfil the condition $\mu r < 2$. In this expression r is the radius of the cylindrical sample expressed in cm, and μ the linear absorption coefficient, defined by the expression

$$\mu = \frac{\rho N \sum_i n_i \mu_{a_i}}{\sum_i n_i a_i}$$

where

ρ is the density of the solution

N is the Avogadro number

n_i is the concentration of the atomic species i

μ_{α_i} is the atomic absorption coefficient for the atomic species i (taken from Int. Tabl.)

a_i is the atomic weight of the atomic species i .

The condition $\mu r < 2$ for reasonable values of r (~ 0.025 cm) can be fulfilled in a solution containing lighter and heavier atoms if the concentrations of the latter are not too high. Thus the concentration of a solute containing heavier atoms must be kept under a certain limiting value. On the other hand, if the structure of the solute is the aim of the investigation, its concentration must be sufficiently high to influence the distribution function of the solution to a measurable degree. This second condition is fulfilled when at least 5–10 % of the electrons in the solution belong to the solute.

The determination of the structure of a solute is based on the calculation of the distribution functions of the solution and of the pure solvent. It seems to be easier to describe these calculations if a short deduction of the formulas used in the following is given.

When a monochromatic, unpolarized X-ray beam with intensity I_0 falls upon a liquid sample, the beam is refracted. The total intensity I_T of the refracted beam is composed of a coherent part I_c and an incoherent part I_{inc} . Consequently:

$$I_T = I_c + I_{inc} \quad (1)$$

For I_c and I_{inc} the following expressions are deduced:

$$I_c = I_e \int_0^\infty \sigma(r) \frac{\sin sr}{sr} dr \quad (2)$$

$$I_{inc} = I_e \sum S_i^2 \quad (3)$$

In these expressions I_e has the following significance:

$$I_e = I_0 \cdot \frac{e^4}{R^2 m^2 c^4} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad (4)$$

where

e = the charge of the electron

m = the mass of the electron

c = the velocity of light

R = the distance between the liquid sample and the point of observation

2θ = the scattering angle

¹ FINBAK 1943.

² The relativistic factor may here be neglected.

$\sigma(r)dr$ = the double probability of any two charges being at a distance r to $r + dr$ from each other

$s = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$, where λ is the wave length of the incident beam

For the significance of the function S see BEWILOGUA (1931).

FINBAK (l. c.) has shown that it is very suitable to split up the function $\sigma(r)$ in the following way:

$$\sigma(r) = \sum_i \sigma_{ai}(r) + \sigma_m(r) \quad (5)$$

where the *intra-atomic distribution function* $\sigma_{ai}(r)$ expresses the probable distribution of the electronic distances within the respective atoms. In the same way the *interatomic distribution function* $\sigma_m(r)$ expresses the probable distribution of distances between any two electrons each belonging to different atoms. Consequently a well defined and frequent atomic distance r_1 will manifest itself in a system as a maximum of the function $\sigma_m(r)$ for $r = r_1$. Calculation of the function $\sigma_m(r)$ may thus give valuable information as to the atomic distances present in a liquid. From (5) and (2) we have:

$$I_c = I_e \sum_i \int_0^\infty \sigma_{ai}(r) \frac{\sin sr}{sr} dr + I_e \int_0^\infty \sigma_m(r) \frac{\sin sr}{sr} dr \quad (6)$$

But

$$\int_0^\infty \sigma_{ai}(r) \frac{\sin sr}{sr} dr = f_i^2 \quad (7)$$

where f_i , is the atomic scattering factor of the atom i .

From (1), (3), (4) and (7) we have:

$$I_T = I_0 \frac{e^4}{R^2 m^2 c^4} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \left[\int_0^\infty \sigma_m(r) \frac{\sin sr}{sr} dr + \sum_i (f_i^2 + S_i) \right] \quad (9)$$

Equation (9) is exact only in the case when the radiation used is unpolarized and when $\mu = 0$. In the practical case described below these conditions are not fulfilled. The radiation used (CuK_α and MoK_α) was monochromatized with a rock salt crystal, and consequently polarized to a certain degree. The liquids investigated were contained in glass capillary tubes thinner than the incident beam and with wall thickness of about 0.01–0.02 mm. Especially when using CuK_α -radiation, the absorption could not be neglected. Correcting for polarization and absorption, the formula (9) becomes as follows:

$$I'_T = I_0 \frac{e^4}{R^2 m^2 c^4} P(s) \cdot A(s) \left[\int_0^\infty \sigma_m(r) \frac{\sin sr}{sr} dr + \sum_i (f_i^2 + S_i) \right] \quad (10)$$

where $P(s)$ is the polarization factor. For this factor we have

$$P(s) = \frac{1 + k \cos^2 2\theta}{2}$$

In connection with CuK_α -radiation, k has the numerical value 0.723 and in the case of MoK_α -radiation the value 0.937 (MORGAN and WARREN 1938). The absorption factor $A(s)$ can be evaluated, if the diameter and the composition of the cylindrical sample are given (BLAKE, 1933).

In the expression (10) we now put

$$\frac{I'_T}{I_0} = I_t(s) \quad (11)$$

and

$$\sum_i (f_i^2 + S_i) = B(s) \quad (12)$$

Thus getting

$$I_t(s) = \frac{e^4}{R^2 m^2 c^4} \cdot P(s) \cdot A(s) \left[\int_0^\infty \sigma_m(r) \frac{\sin sr}{sr} dr + B(s) \right] \quad (13)$$

and consequently

$$\int_0^\infty \sigma_m(r) \frac{\sin sr}{sr} dr = \frac{R^2 m^2 c^4}{e^4} \cdot \frac{I_t(s)}{P(s) \cdot A(s)} - B(s). \quad (14)$$

Putting

$$\frac{R^2 m^2 c^4}{e^4} \cdot \frac{I_t(s)}{P(s) \cdot A(s)} = I_m(s) \quad (15)$$

we have

$$\int_0^\infty \sigma_m(r) \frac{\sin sr}{sr} dr = I_m(s) - B(s) = I(s). \quad (16)$$

Applying Fourier's integral theorem to the expression (16) we finally get

$$\sigma_m(r) = \frac{2}{\pi} \cdot r \cdot \int_0^\infty I(s) s \sin sr ds. \quad (17)$$

The calculation of the distribution function $\sigma_m(r)$ is consequently possible if the function $I(s)$ is given. According to (16) the latter consists of two terms. One of them, the function $B(s)$ or "the background", can be calculated if the composition of the liquid is known. The other term, $I_m(s)$, contains the factor $I(s)$ which is to be determined empirically.

The practical determination of distribution functions

X-ray photograms were taken with $\text{Cu}_{K\alpha}$ - and $\text{Mo}_{K\alpha}$ -radiation of samples fulfilling the conditions described in the preceding section. From photometer records of these photographs the intensity curves in arbitrary units and with arbitrary zero line were calculated in the usual way. These empirical intensity curves emphasized two intervals of the functions $I_t(s)'_{\text{Cu}}$ and $I_t(s)''_{\text{Mo}}$ with the following relation to the function $I_t(s)$:

$$I_t(s)'_{\text{Cu}} \cdot k'_1 + k'_2 = I_t(s)$$

and

$$I_t(s)''_{\text{Mo}} \cdot k''_1 + k''_2 = I_t(s)$$

where k'_1 , k'_2 , k''_1 and k''_2 are constants.

The width of the interval that may be obtained in this way depends to a certain degree on the construction of the camera. With the equipment used in this case the following intervals could be measured

$$I_t(s)'_{\text{Cu}}: \quad 0.7 < s < 5.1$$

$$I_t(s)''_{\text{Mo}}: \quad 2.1 < s < 11.9$$

If the constants k'_1 , k'_2 , k''_1 and k''_2 can be determined, it is possible to calculate the function $I_t(s)$ and consequently $I(s)$ in the interval $0.7 < s < 11.9$.

The determination of these constants is based on the behaviour of the curve $I_m(s)$, which oscillates about the smooth curve $B(s)$, the amplitudes diminishing with increasing s . Consequently, one has to search for such values of the constants in question that give the curve $I_m(s)$ this orientation in relation to the curve $B(s)$.

In this way the available part of the function $I(s)$ can be obtained in the form of a table. The values of $I(s)$ given later were calculated for $s = 0.7$ $0.9 \dots 11.9$, i.e. for odd tenth of s in the interval mentioned above. For the purpose of an exact calculation of the distribution function $\sigma_m(r)$ this material of course is insufficient. According to (17), we have

$$\sigma_m(r) = \frac{2}{\pi} r \int_0^{\infty} I(s) s \sin sr \, ds$$

With the material available only the following operation is possible

$$\sigma_m(r) = \frac{2}{\pi} r \sum_{s=0}^{s=s_n} I(s) s \sin sr \mathcal{A} s \quad (18)$$

where $\mathcal{A} s = 0.2$ and s_n is about 10. Such a calculation implies that $I(s)$ is considered to be zero in the interval $10 < s < \infty$. Further could values of $I(s)$ in the interval $0 < s < 1$ be obtained only by extrapolation. However, FINBAK has shown that these approximations do not influence the general character of the distribution function and the positions of its maxima.

Finally, the calculation of $B(s)$ is based on the following expression:

$$B(s) = \sum_i (f_i^2 + S_i)$$

and can be performed with the aid of the values given for the atomic scattering factors f , and the function S (COMPTON and ALLISON l.c. and BEWILGUA l.c.).

The determination of distribution functions of solutions of molybdenum chloroacid in ethyl alcohol and of ethyl alcohol itself

In connection with the determination by X-ray methods of the configuration of bivalent molybdenum halogenides in solution, the first problem was to choose a suitable compound and a suitable solvent. Soon it could be established that only a few simple systems could be considered. Among these the solutions of molybdenum chloroacid in ethyl alcohol seemed to fulfil all the important requirements. These solutions are stable. The solvent contains only light atoms. The solubility of chloroacid in alcohol is sufficient. Further chloroacid can be obtained in a very pure form as it recrystallizes easily. Hence this system was chosen. Chloroacid was obtained in the usual way from a solution of MoCl_2 in HCl 1:1. After recrystallization the compound was kept in a desiccator containing conc. HCl . A sample of the preparation was dried for an hour in air and analysed with respect to Cl and Mo.

The chlorine content was determined in the following way: a weighed sample of the preparation containing about 0.03 g Cl was dissolved in 50 ml water and oxidized with $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ in some excess. After decomposition of this excess and dilution up to 200 ml, $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ was added, and the solution was acidified with H_2SO_4 . This resulted in the precipitation of Mo_2S_3 , that was filtered off. Cl was determined in the filtrate in the usual way.

The content of molybdenum was determined as follows. A weighed sample of the preparation, containing about 0.1 g Mo was dissolved in 10 ml of a tenth normal solution of NaOH , diluted to 100 ml and oxidized with H_2O_2 . The excess of the latter was decomposed by boiling, the solution diluted to 200 ml, neutralized and acidified with 10 ml conc. H_2SO_4 . After cooling down to 8°C , 60 ml of a solution of 2 g α -benzoinoxime in 100 ml alcohol was slowly added under stirring. During continuous cooling, bromine water was added until

the solution became faintly yellow and after this 5 ml more of the α -benzoin-oxime solution.

After half an hour (8°C) the precipitation was filtered off, washed with 100 ml of a solution containing 5 ml conc. H_2SO_4 and 5 ml of the alcoholic solution of α -benzoinoxime, dried and ignited to constant weight in a platinum crucible.

The result of the analysis was the following:

Found	Calculated from the formula
	$[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]\{\text{Cl}_6\} \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
Cl % 41.1	40.75
Mo % 46.8	47.26

As only a few grams of the preparation were at my disposal, the solutions were prepared in the pycnometer-resembling device illustrated in Fig. 2. The three parts of this device are as follows: a glass bulb holding about 1 ml and supplied with a conically ground neck (a); a stopper in the shape of a capillary tube fitting into the neck of the bulb (b); a glass plate functioning as a cover (c). The solid chloroacid was put directly into and weighed in the bulb. The alcohol was let in by means of capillary tube through the stopper. The volume of the device was established by weighing it empty and filled with water. The preparation of the solutions in this way thus made it possible to determine their content of chloroacid and alcohol and their densities.

The compositions and absorption properties of the liquids investigated with X-rays are summed up in Table 1.

Table 1

$t = 19^\circ\text{C}$

Liquid investigated	g chloroacid	g $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	ϱ	r mm	$\mu_{r_{\text{CuK}\alpha}}$	$\mu_{r_{\text{MoK}\alpha}}$
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	—	—	0.79	0.25	0.14	~ 0
Solution 1	0.0773	0.5527	0.88	0.26	0.49	0.057
» 2	0.1550	0.5310	0.96	0.25	0.80	0.096

The X-ray data obtained with these liquids are given in Tables 2, 3 and 4. Figures in italics denote $I_m(s)$ and $sI(s)$ values obtained by extrapolation of the $I_m(s)$ curve to $s=0$. This extrapolation has been performed in two different ways:

$$\text{Column I: } \lim_{s \rightarrow 0} I_m(s) = B(s)$$

$$\text{Column II: } \lim_{s \rightarrow 0} I_m(s) = 0$$

Table 2

Ethyl alcohol

<i>s</i>	<i>B(s)</i>	<i>I_m(s)_{CuKα}</i>		<i>I_m(s)_{MoKα}</i>	<i>s · I(s)</i>		<i>s</i>	<i>B(s)</i>	<i>I_m(s)_{MoKα}</i>	<i>s · I(s)</i>
		I	II		I	II				
0.0	15.78	15.78	0		0	0	5.1	3.91	4.62	+3.62
1	15.60	12.0	3.25		-0.36	-1.23	3	3.84	4.44	+3.18
3	15.40	8.5	5.25		-2.07	-3.05	5	3.77	4.22	+2.48
5	14.75	7.4	6.5		-3.68	-4.13	7	3.70	4.04	+1.94
7	14.12	7.25	7.15		-4.81	-4.88	9	3.64	3.90	+1.53
9	13.45		7.46			-5.39	6.1	3.58	3.76	+1.10
1.1	12.60		8.19			-4.85	3	3.53	3.67	+0.88
3	11.64		9.88			-2.29	5	3.50	3.55	+0.33
5	10.75		11.98			+1.85	7	3.47	3.46	-0.07
7	9.85		10.79			+1.60	9	3.44	3.40	-0.28
9	9.15		9.63			+0.91	7.1	3.42	3.37	-0.36
2.1	8.52		8.69	7.99		+0.36	3	3.40	3.34	-0.44
3	7.90		7.64	7.16		-0.60	5	3.38	3.34	-0.30
5	7.34		6.64	6.44		-1.75	7	3.36	3.35	-0.08
7	6.80		6.19	5.97		-1.65	9	3.35	3.36	+0.08
9	6.32		5.97	5.78		-1.02	8.1	3.33	3.34	+0.08
3.1	5.92		5.64	5.51		-0.87	3	3.31	3.35	+0.33
3	5.55		5.34	5.33		-0.69	5	3.30	3.35	+0.43
5	5.26		5.20	5.20		-0.21	7	3.29	3.33	+0.35
7	4.98		5.15	5.17		+0.70	9	3.28	3.31	+0.27
9	4.75		5.14	5.25		+1.95	9.1	3.27	3.28	+0.09
4.1	4.53		5.04	5.27		+2.89	3	3.26	3.22	-0.37
3	4.36		4.93	5.22		+3.70	5	3.25	3.22	-0.29
5	4.22		4.84	5.10		+3.96	7	3.24	3.21	-0.29
7	4.10		4.73	4.97		+4.09	9	3.23	3.20	-0.30
9	4.00		4.68	4.78		+3.82				

The real values may lie within those limits. The calculation of $sI(s)$ for lower s -values is based on $I_m(s)$ data obtained with copper radiation, for higher s -values with molybdenum radiation. The transitions are marked in the columns containing $I_m(s)$ -values.

The final calculation of the distribution functions, which in the following are simply denoted by $\sigma(r)$ -functions (i.e. without the index), is the result of the following operation:

$$\sigma(r) = r \sum_{s=0}^{s=9.9} sI(s) \sin sr \Delta s \quad (19)$$

where $\Delta s = 0.2$. The factor $\frac{2}{\pi}$ from equation (18) has been omitted as only relative values of $\sigma(r)$ are of interest. The result of this calculation is given in Table 5, which also contains the differences between $\sigma(r)$ -functions of the solutions and the solvent. The notations I and II correspond to the two different ways of extrapolation. Finally, the functions $\sigma(r)_{\text{sol 2}} - \sigma(r)_{\text{alc}}$ and $\sigma(r)_{\text{sol 1}} - \sigma(r)_{\text{alc}}$ are given in form of diagrams in Fig. 3.

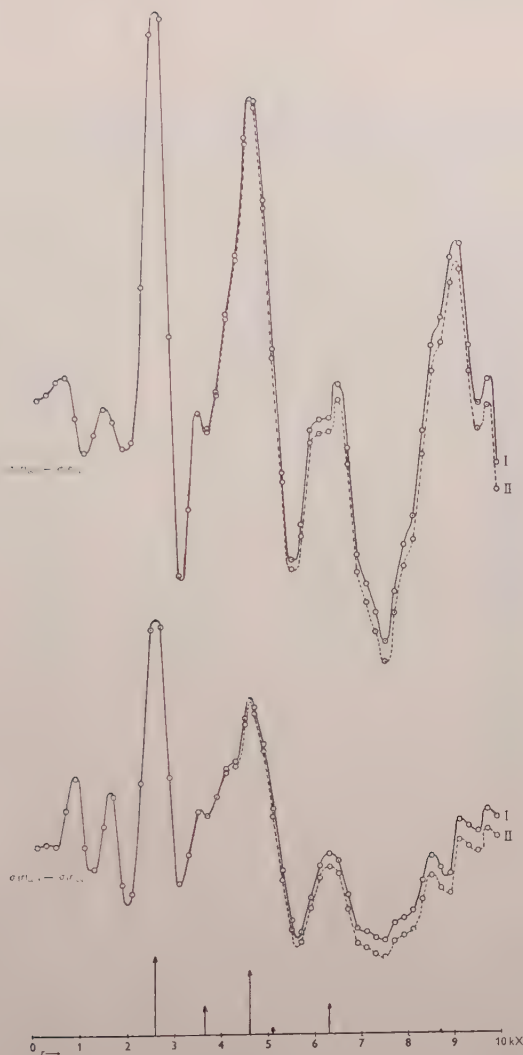


Fig. 3.

Interpretation of the $\sigma(r)$ -functions

In an earlier section was mentioned the fact that a maximum in a $\sigma(r)$ -curve represents a distance between accumulations of electrons, i.e. between atoms. Hence, if in a liquid system the atomic species X_1 and X_2 occur with the frequency f at a mutual distance r_1 , there will be a peak in the $\sigma(r)$ -curve for $r = r_1$. The height of this peak will be approximately proportional to the weight of the corresponding distance, i. e. $f Z_1 Z_2$. An analysis of a $\sigma(r)$ -function may consequently give an idea of the atomic distances present in the system whose weight is not too small. Some facts must be borne in mind in

Table 3
Solution 1

s	$B(s)$	$I_m(s)_{CuK\alpha}$		$I_m(s)_{MoK\alpha}$	$s \cdot I(s)$		s	$B(s)$	$I_m(s)_{MoK\alpha}$	$s \cdot I(s)$
		I	II		I	II				
0.0	24.12	24.12	0		0	0	5.1	6.45	7.42	+4.95
1	23.85	24.1	6.5		+0.02	-1.74	3	6.28	7.31	+5.46
3	23.15	23.9	19.0		+0.23	-1.25	5	6.12	7.07	+5.23
5	22.40	23.3	23.0		+0.45	+0.30	7	5.98	6.61	+3.59
7	21.55		20.60			-0.67	9	5.89	6.25	+2.12
9	20.70		14.93			-5.19	6.1	5.71	5.83	+0.73
1.1	19.75		13.32			-7.07	3	5.60	5.48	-0.76
3	18.65		15.16			-4.54	5	5.50	5.25	-1.63
5	17.50		18.60			+1.65	7	5.40	5.07	-2.21
7	16.25		16.68			+0.73	9	5.30	5.03	-1.86
9	14.95		14.95			± 0.00	7.1	5.22	5.06	-1.14
2.1	13.80		13.70	12.56		-0.21	3	5.15	5.09	-0.44
3	12.90		12.49	11.65		-0.94	5	5.08	5.16	+0.60
5	12.05		11.31	11.14		-1.85	7	5.01	5.20	+1.46
7	11.30		11.44	11.10		+0.38	9	4.95	5.18	+1.82
9	10.60		11.58	11.03		+2.84	8.1	4.88	5.08	+1.62
3.1	9.90		11.15	10.39		+3.88	3	4.80	4.99	+1.58
3	9.30		10.17	9.74		+2.87	5	4.75	4.88	+1.11
5	8.80		8.97	8.80		+0.60	7	4.69	4.74	+0.44
7	8.38		8.25	8.38		-0.48	9	4.63	4.64	+0.09
9	8.00		8.00	8.13		± 0.00	9.1	4.57	4.57	± 0.00
4.1	7.68		7.93	8.03		+1.03	3	4.52	4.49	-0.28
3	7.39		7.79	7.87		+1.72	5	4.48	4.45	-0.29
5	7.11		7.59	7.60		+2.16	7	4.42	4.44	+0.19
7	6.87		7.47	7.37		+2.35	9	4.38	4.40	+0.20
9	6.65		7.61	7.37		+3.53				

connection with such an analysis of a $\sigma(r)$ -curve obtained by the method described here.

1) In the interval $1 < r < 8$ kX the $\sigma(r)$ -functions are qualitatively well reproducible;

2) In the interval $0 < r < 1$ kX peaks often appear without physical reality. These peaks are generally caused by the approximations and by the errors in the calculation of $I(s)$ from $I_t(s)$;

3) In the region $r > 8$ kX the $\sigma(r)$ -curves obtained are quite uncertain, as errors in measurements greatly influence the result here;

4) The heights of the peaks are much more influenced by errors in measurements than their positions;

5) Different atomic distances, which do not differ much one from the other, often give broad undissolved peaks;

6) The peaks may correspond either to distances between atoms within a molecule or radical — bond distances — or to distances between atoms belonging to different molecules or radicals — packing distances.

From the statements mentioned above it follows that some of the peaks in the curves given in Fig. 3 may correspond to interatomic distances, and that

Table 4
Solution 2

s	$B(s)$	$I_m(s)_{\text{Cu}K\alpha}$		$I_m(s)_{\text{Mo}K\alpha}$	$s \cdot I(s)$		s	$B(s)$	$I_m(s)_{\text{Mo}K\alpha}$	$s \cdot I(s)$
		I	II		I	II				
0.0	32.51	32.51	0		0	0	5.1	9.02	10.29	+6.48
1	32.10	32.5	11.0		+0.04	-2.10	3	8.71	10.20	+7.90
3	31.13	32.3	27.5		+0.36	-1.08	5	8.45	9.89	+7.92
5	30.15	31.8	31.5		+0.80	+0.70	7	8.22	9.33	+6.33
7	29.15		30.17			+0.70	9	8.04	8.65	+3.60
9	28.02		21.80			-5.60	6.1	7.84	7.85	+0.06
1.1	26.83		18.83			-8.80	3	7.65	7.25	-2.52
3	25.55		21.62			-5.11	5	7.47	6.88	-3.84
5	24.10		26.18			+3.12	7	7.31	6.64	-4.49
7	22.40		22.53			+0.22	9	7.15	6.60	-3.80
9	20.70		19.57			-2.15	7.1	7.00	6.63	-2.63
2.1	19.15		17.54	18.39		-3.38	3	6.87	6.66	-1.53
3	17.90		16.52	17.01		-3.17	5	6.76	6.76	± 0.00
5	16.80		15.98	16.18		-2.05	7	6.65	6.81	+1.23
7	15.77		16.67	16.11		-2.43	9	6.54	6.72	+1.42
9	14.82		17.52	16.56		+7.83	8.1	6.43	6.53	+0.81
3.1	13.95		17.03	15.85		+9.55	3	6.32	6.32	± 0.00
3	13.08		15.19	14.59		+6.96	5	6.21	6.13	-0.68
5	12.39		13.08	12.88		+2.42	7	6.10	5.98	-1.04
7	11.81		11.49	11.93		+0.44	9	6.00	5.86	-1.25
9	11.29		11.07	11.08		-0.82	9.1	5.90	5.76	-1.27
4.1	10.85		10.87	11.07		+0.90	3	5.81	5.71	-0.93
3	10.40		10.78	10.94		+2.32	5	5.71	5.67	-0.38
5	10.05		10.66	10.54		+2.21	7	5.62	5.66	+0.39
7	9.70		10.52	10.27		+2.68	9	5.53	5.69	+1.58
9	9.35		10.66	10.19		+4.12				

some may be the result of errors in measurement or of approximations. The real peaks of the curve 2 must, however, have about double the weight of the corresponding peaks of the curve 1, as the concentration of chloroacid in solution 2 was about twice that of solution 1. Hence the two small peaks in the region $0 < r < 1.9$ kX are surely unreal. The one at $r = 1.5$ kX is in fact the residue of a big peak belonging to the distribution function of alcohol. In the region $r > 8$ kX the curves are not perspicuous. As has been mentioned above, the influence of the different errors is pronounced here. It is, however, not out of the question that the peak complex at about 9 kX corresponds to packing distances, as it may be expected that some of them are of this order of magnitude. Further, the great width of the peak complex at 4.5 kX seems to indicate that bond and packing distances overlap here. On the other hand, the well developed peaks with r -values 2.6, 3.6, 4.6 and 6.4 kX surely correspond to bond distances within the molecular species of molybdenum chloroacid. Consequently it remains to evaluate what sort of grouping of molybdenum and chlorine atoms satisfies the behaviour of the curves in Fig. 3, in the interval $2 < r < 8$ kX. To perform such an analysis without any assumptions is very difficult. In this case, however, the task may

Table 5
 $\sigma(r)$ -functions

r	Ethyl alcohol		Solution 1		Solution 2		$\sigma(r)_{\text{sol 1}} - \sigma(r)_{\text{alc}}$		$\sigma(r)_{\text{sol 2}} - \sigma(r)_{\text{alc}}$	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0.1	+ 1.32	+ 1.31	+ 1.82	+ 1.82	+ 1.41	+ 1.41	+ 0.50	+ 0.51	+ 0.09	+ 0.10
3	+ 7.87	+ 7.81	+ 9.79	+ 9.72	+ 10.80	+ 10.73	+ 1.92	+ 1.91	+ 2.93	+ 2.92
5	+ 5.08	+ 4.92	+ 6.44	+ 5.97	+ 14.84	+ 14.67	+ 1.06	+ 1.05	+ 9.76	+ 9.74
7	-15.94	-16.25	+ 4.12	+ 3.78	- 3.87	- 4.21	+ 20.06	+ 20.03	+ 12.07	+ 12.04
9	-38.53	-39.05	- 1.07	- 1.62	- 48.18	- 48.74	+ 37.46	+ 37.43	- 9.65	- 9.69
1.1	-39.49	-40.26	- 39.10	- 39.92	- 67.69	- 68.52	+ 0.39	+ 0.34	- 28.20	- 28.26
3	-16.52	-17.58	- 27.61	- 28.76	- 34.89	- 36.05	- 11.09	- 11.18	- 18.37	- 18.47
5	+10.40	+ 9.02	+ 21.88	+ 20.37	+ 6.12	+ 4.60	+ 11.48	+ 11.35	- 4.28	- 4.42
7	+11.50	+ 9.75	+ 28.78	+ 26.86	+ 1.32	+ 0.62	+ 17.28	+ 17.11	- 10.18	- 10.37
9	-23.57	-25.71	- 43.47	- 45.85	- 49.08	- 51.48	- 19.90	- 20.14	- 25.51	- 25.77
2.1	-60.16	-62.72	- 84.56	- 87.43	- 82.43	- 85.33	- 24.40	- 24.71	- 22.27	- 22.61
3	-66.77	-69.78	- 31.87	- 35.27	- 5.46	- 8.90	+ 34.90	+ 34.51	+ 61.31	+ 60.88
5	-63.24	-66.69	+ 54.25	+ 50.28	+132.78	+128.77	+117.49	+116.97	+196.02	+195.46
7	-62.63	-66.54	+ 56.05	+ 51.50	+141.36	+136.74	+118.68	+118.04	+203.99	+203.23
9	-50.71	-55.08	- 12.75	- 17.92	- 15.71	- 20.96	+ 37.96	+ 37.16	+ 35.00	+ 34.12
3.1	-25.02	-29.86	- 44.41	- 50.21	-119.08	-124.99	- 19.38	- 20.35	- 94.06	- 95.13
3	-16.26	-21.54	- 20.04	- 26.49	- 74.64	- 81.23	- 3.78	- 4.95	- 58.38	- 59.69
5	-17.32	-23.04	+ 2.24	- 4.98	- 23.87	- 31.15	+ 19.56	+ 18.06	- 6.55	- 8.11
7	- 3.31	- 9.46	+ 14.38	+ 6.59	- 17.92	- 25.91	+ 17.69	+ 16.05	- 14.61	- 16.42
9	+10.36	+ 3.81	+ 38.05	+ 29.58	+ 15.97	+ 7.26	+ 27.69	+ 25.77	+ 5.61	+ 3.43
4.1	+19.99	+13.07	+ 62.70	+ 53.56	+ 67.12	+ 57.45	+ 42.71	+ 40.49	+ 47.13	+ 44.33
3	+36.19	+28.92	+ 82.73	+ 72.92	+114.87	+104.72	+ 46.54	+ 44.00	+ 78.68	+ 75.80
5	+37.31	+29.73	+106.83	+ 96.36	+178.58	+167.72	+ 69.52	+ 66.63	+141.27	+137.99
7	+42.72	+34.87	+118.18	+107.07	+203.82	+192.41	+ 75.46	+ 72.20	+161.10	+157.54
9	+41.75	+33.66	+ 97.60	+ 85.86	+150.08	+137.82	+ 55.85	+ 52.20	+108.33	+104.16
5.1	+41.51	+33.22	+ 62.50	+ 50.15	+ 70.27	+ 57.32	+ 20.99	+ 16.93	+ 28.76	+ 24.10
3	+27.33	+18.88	+ 14.52	+ 1.59	- 10.66	- 24.28	- 12.81	- 17.29	- 37.99	- 43.16
5	+ 9.86	+ 1.29	- 29.47	- 42.96	- 75.06	- 89.32	- 39.39	- 44.25	+ 84.92	+ 90.61
7	+ 2.61	- 6.04	- 42.89	- 56.91	- 63.52	- 78.39	- 45.50	- 50.87	- 66.16	- 72.33
9	+ 0.09	- 8.60	- 26.92	- 41.42	- 15.23	- 30.69	- 27.01	- 32.82	- 15.32	- 22.09
6.1	- 1.20	- 9.88	- 11.01	- 25.97	- 10.89	- 26.91	- 9.81	- 16.09	- 9.69	- 17.03
3	- 0.37	- 9.02	- 4.02	- 19.41	- 8.87	- 25.42	- 3.65	- 10.39	- 8.50	- 16.44
5	- 2.26	-10.83	- 9.20	- 24.96	+ 7.54	- 9.50	- 6.94	- 14.13	+ 9.80	+ 1.33
7	- 8.31	-16.78	- 33.74	- 49.83	- 32.87	- 50.36	- 25.43	- 33.05	- 24.56	- 33.51
9	-14.48	-22.82	- 58.28	- 74.66	- 96.55	-114.47	- 43.80	- 51.84	- 82.07	- 91.64
7.1	-17.97	-26.15	- 63.41	- 80.04	-115.69	-133.98	- 45.44	- 53.89	- 97.72	-107.83
3	-18.34	-26.34	- 67.00	- 83.83	-131.12	-149.74	- 48.66	- 57.49	-112.78	-123.44
5	-20.01	-27.79	- 69.82	- 86.81	-148.82	-167.73	- 49.81	- 59.02	-128.81	-139.94
7	-23.49	-31.06	- 64.38	- 81.48	-125.26	-144.42	- 40.89	- 50.42	-101.77	-113.34
9	-20.72	-28.05	- 58.63	- 75.80	- 97.04	-116.41	- 37.91	- 47.75	- 76.32	- 88.34
8.1	-13.25	-20.34	- 47.62	- 64.81	- 74.59	- 94.13	- 34.37	- 44.47	- 61.34	- 73.77
3	+ 0.13	- 6.70	- 17.73	- 34.91	- 15.04	- 34.69	- 17.86	- 28.21	- 15.17	- 27.99
5	+ 9.99	+ 3.40	+ 5.51	- 11.60	+ 40.36	+ 20.62	- 4.48	- 15.00	+ 30.37	+ 17.22
7	+18.02	+11.76	+ 6.25	- 10.16	+ 63.84	+ 44.07	- 11.17	- 21.92	+ 45.82	+ 32.33
9	+23.83	+17.75	+ 9.81	- 7.06	+102.24	+ 82.49	- 14.02	- 24.81	+ 78.41	+ 64.77
9.1	+31.11	+25.27	+ 46.04	+ 29.35	+116.90	+ 97.18	+ 14.93	+ 4.08	+ 85.79	+ 71.94
3	+33.45	+27.85	+ 45.16	+ 28.70	+ 64.64	+ 45.00	+ 11.71	+ 0.85	+ 31.19	+ 17.11
5	+24.26	+18.89	+ 33.18	+ 16.97	+ 24.47	+ 4.95	+ 8.92	- 1.92	+ 0.21	- 13.94
7	+19.65	+14.50	+ 40.51	+ 24.57	+ 32.87	+ 13.50	+ 20.86	+ 10.07	+ 13.22	- 1.03
9	+23.96	+19.02	+ 40.80	+ 25.18	- 8.37	- 27.55	+ 16.84	+ 6.16	- 32.33	- 46.57

Table 6

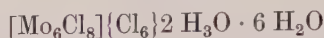
a				b				c			
[Mo ₆ Cl ₈] {(OH) ₄ (H ₂ O) ₂ } · 12 H ₂ O				[Mo ₆ Cl ₈] {Cl ₄ (H ₂ O) ₂ } · 6 H ₂ O				[Mo ₆ Cl ₈] {Cl ₆ } 2 H ₃ O · 6 H ₂ O			
	<i>r</i> kX	<i>f</i>	<i>r̄</i> kX		<i>r</i> kX	<i>f</i>	<i>r̄</i> kX		<i>r</i> kX	<i>f</i>	
Mo—Mo	2.64	6	2.63	Mo—Mo	2.62	8	2.64	Mo—Mo	2.64	12	
	2.62	6			2.69	4					
	3.66	3			3.80	2			3.73	3	
					3.60	1		Cl _I —Cl _I	3.60	12	
Cl—Cl	3.57	6	3.61	Cl _I —Cl _I	3.60	12	3.60		5.10	12	
	3.64	6			5.10	12			6.24	4	
	5.00	6			6.24	4		Cl _{II} —Cl _{II}	6.15	12	
	5.18	6							8.70	4	
	6.40	1		Mo—Cl _I	2.54	8		Mo—Cl _I	2.55	24	
	6.20	3			2.55	16			4.45	24	
Mo—Cl	2.50	12			4.40	8		Mo—Cl _{II}	2.48	6	
	2.58	6		Cl _{II} —Cl _{II}	6.15	4	6.15		4.75	24	
	2.60	6			8.70	2			6.22	6	
	4.39	6		Mo—Cl _{II}	2.45	4		Cl _I —Cl _{II}	3.61	24	
	4.40	12			4.71	8			6.65	24	
	4.55	6			4.75	8					
					6.25	4					
				Cl _I —Cl _{II}	3.61	16					
					6.65	16					

be limited to proving whether the central group of the complexes present in the solutions is [Mo₆Cl₈]⁴⁺ or [Mo₃Cl₄]²⁺.

From X-ray crystallographical investigations we may conclude that the highly symmetrical group [Mo₆Cl₈]⁴⁺ hardly suffers any change in its interatomic distances, when Cl⁻ is substituted for the ligands OH⁻ or H₂O. This makes a rather sure calculation of the interatomic distances in the structure element of the solid chloroacid (Fig. 1 d) possible. Such a calculation can be based on three fundamental distances, viz. the octahedron edge of the staphylo-nucleus (the shortest distance Mo—Mo), the edge of the chlorine cube (shortest distance Cl_I—Cl_I) and the edge of the octahedron formed by the chlorine atoms functioning as ligands (shortest distance Cl_{II}—Cl_{II}). With the guidance of the interatomic distances obtained empirically of the compounds [Mo₆Cl₈]{(OH)₄(H₂O)₂} · 12 H₂O and [Mo₆Cl₈]{Cl₄(H₂O)₂} · 6 H₂O (Table 6 a and b), these fundamental distances in the molecule of chloroacid may be ascribed the following values (in italics in Table 6 c):

Mo—Mo	2.65 kX
Cl _I —Cl _I	3.60 kX
Cl _{II} —Cl _{II}	6.15 kX

Table 7



	r kX	f	$f \cdot Z_1 Z_2 \cdot 10^{-3}$	$\bar{r}$ kX	$\Sigma f \cdot Z_1 \cdot Z_2 \cdot 10^{-3}$
Mo —Cl _{II}	2.48	6	4.3	2.59	42.6
Mo —Cl _I	2.55	24	17.1		
Mo —Mo	2.64	12	21.2		
Cl _I —Cl _I	3.60	12	3.5	3.65	15.7
Cl _I —Cl _{II}	3.61	24	6.9		
Mo —Mo	3.73	3	5.3		
Mo —Cl _I	4.45	24	17.1	4.60	34.2
Mo —Cl _{II}	4.75	24	17.1		
Cl _I —Cl _I	5.10	12	3.5	5.10	3.5
Cl _{II} —Cl _{II}	6.15	12	3.5	6.39	15.9
Mo —Cl _{II}	6.22	6	4.3		
Cl _I —Cl _I	6.24	4	1.2		
Cl _I —Cl _{II}	6.65	24	6.9		
Cl _{II} —Cl _{II}	8.70	4	1.2	8.70	1.2

The remaining interatomic distances calculated from the above values are given in Table 6 c. Finally, Table 7 contains the weighed average values of groups of closely lying distances and their weights, that is the positions and heights of the respective peaks in a $\sigma(r)$ -curve corresponding to the assumed grouping of atoms in the solid state of chloroacid. These pairs of values are represented graphically as arrows in Fig. 3. Here the positions of the arrows denote the calculated average distances and their heights the corresponding relative weights. From Fig. 3 it appears that the agreement between the distance distribution obtained empirically and the one calculated in Tables 6 and 7 is very good. This result can be summed up as follows:

The complex groups of molybdenum chloroacid present in its solution in ethyl alcohol give rise to distribution functions which are satisfied by an atomic arrangement based on the staphylo-nuclear central group $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$.

It remains to be examined if there are also some complex groups containing the hypothetical radical $[\text{Mo}_3\text{Cl}_4]^{2+}$ that can give rise to distribution functions in agreement with the ones obtained empirically. An analysis of this problem immediately shows that only three arrangements of the three molybdenum atoms may be taken into consideration in this case. These arrangements are shown in Fig. 4 a, b and c. Consequently, the splitting up of the radical $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ may proceed in three different ways, as is indicated in Fig. 4 d, e and f. In the first two alternatives (Fig. 4 d and e) the splitting up is not accompanied by any change in the bond angles, but this is the case in the third alternative (Fig. 4 f). The three chlorine atoms functioning as ligands are not

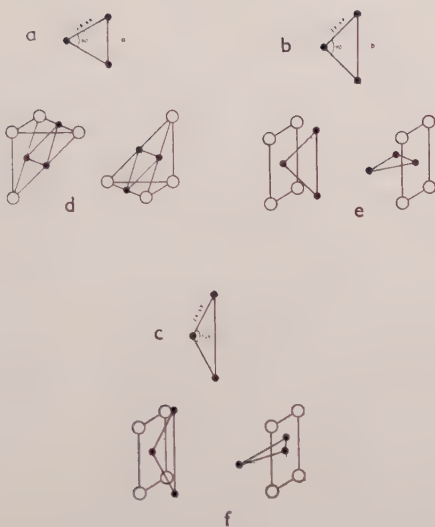


Fig. 4.

drawn in Fig. 4, as it seems difficult in all these cases to give them probable positions. However, in an approximation they may be neglected, and the interatomic distance distribution calculated for the central groups in question. This calculation shows an acceptable agreement with the empirical $\sigma(r)$ -curves.

From all this follows

If the groups of molybdenum chloroacid in ethyl alcoholic solutions are assumed to contain central groups corresponding either to the formula $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ or $[\text{Mo}_3\text{Cl}_4]^{2+}$, it follows from the investigation described above that these central groups may possess only the following configurations:

- 1) Mo_6Cl_8 , Fig. 1 a, structure as in the solid state
- 2) Mo_3Cl_4 , Fig. 4 d
- 3) » » 4 e
- 4) » » 4 f

The deduction of the possible structures given here has been performed on a strictly geometrical basis. In this connection, however, an important fact obtained from the $\sigma(r)$ -functions has not been taken into consideration. As is seen in Fig. 3, the heaviest and narrowest peak of the $\sigma(r)$ -curves is at about 2.6 kX (a little nearer 2.7 than 2.5 kX). This peak must be caused, at least to a considerable degree, by the heavy molybdenum atoms and consequently represents the shortest distance Mo-Mo, which is thus — within the limits of the accuracy of the measurements — the same both in solutions and in the solid state. This implies that the bond type Mo-Mo undergoes no change when solid chloroacid is dissolved in ethyl alcohol, a fact that agrees well with their chemical properties of the compounds in question, i.e. their resistance against oxidation agents, both in the solid state and in acid solution, which is a result of the state of resonance in the group $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$. A splitting up

of this group in the ways indicated in Fig. 4 alters, however, the coordination of the molybdenum atoms and consequently the state of resonance of the group. Expressed in another way, the splitting up of the group $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ must imply a change in the bond type Mo—Mo. This investigation indicates however that no such change occurs when solid chloroacid is dissolved in ethyl alcohol. Consequently among the above four geometrical alternatives agreeing with the $\sigma(r)$ -functions, the three corresponding to the group $[\text{Mo}_3\text{Cl}_4]^{2+}$ are not probable. Alternative $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$, on the other hand, agrees both with the X-ray data obtained and the observed chemical properties. Hence the complexes of molybdenum chloroacid in alcoholic solutions seem to contain the staphylo-nuclear central group $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$.

This investigation has been carried out with financial support from the Nansen foundation in Oslo. The photographs were taken at The Physical Institute of the University of Oslo by courtesy of Professor J. HOLTSMARK. In connection herewith Professor CHR. FINBAK and his collaborators, especially Mr. H. VIERVOLL, have given me much valuable information. For all the kindness, hospitality and help I met with in Norway I beg to express my deep gratitude.

SUMMARY

The method of determining the structure of liquids developed by CHR. FINBAK has been applied to the evaluation of the structure of molybdenum chloroacid in ethyl alcoholic solution. It has been shown that the staphylo-nuclear group $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ present in compounds of this category when in solid state, is unchanged in ethyl alcoholic solutions. Further, it has been shown that in solutions where the solute contains groups with heavy elements and the solvent only light ones, FINBAK's method may give valuable information on the structure of the solute.

REFERENCES. Bewilogua, L. (1931), *PhysZeits*, 32, 740. — Blake, F. C. (1933), *RevModPhys*, 5, 169. — Blomstrand, W. (1859), *JfürpraktCh*, 77, 88. — Brosset, C. (1945), *Arkivkemi*, Bd 20 A, N:o 7, 1. — — (1946), *Arkivkemi*, Bd 22 A, N:o 11, 1. — — (1947), *Arkivkemi*, Bd 25 A, N:o 19, 1. — Compton, A. H. and Allison, S. K., X-rays in Theory and Experiment. — Finbak, Chr. (1943), *Avh. Det Norske Vid. Akad.*, Oslo, Mat.-Nat. Kl., n:r 3. — Lindner, K., Hahn, E., and Helwig, H. (1923), *ZanorgallgCh* 130, 209. — Morgan, I., and Warren, G. E. (1938), *JChemPhys* 6, 666. — Muthmann, W., and Nagel, W. (1898), *Ber* 31, 2009.

Stockholm University, Institute of General and Inorganic Chemistry, 1 May, 1949.

Tryckt den 18 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Zur Kenntnis der Karzinolyse

II. Karyolytische Wirkungen des Blutserums normaler und sarkomatöser Ratten auf fixierte Tumorzellen

Von HANS v. EULER, LEO HELLER und CHRISTINA CURMAN

In der ersten Mitteilung dieser Serie¹ haben wir die FREUND-KAMINER'schen Ansätze zur Deutung² des Mechanismus karzinolytischer Reaktionen behandelt. Die Versuche der genannten Forscher³, die von vielen Autoren mittels verschiedener, immer aber von der ursprünglichen FREUND'schen Technik abweichenden Methoden angestellt worden sind, konnten wir nicht bestätigen; wie wir hervorgehoben haben, spricht unser Ergebnis zwar gegen die Richtigkeit spezieller Folgerungen bzw. Interpretationen der FREUND'schen Grundbeobachtung, nicht aber gegen diese Grundbeobachtung selbst.

Die Richtigkeit dieser Grundbeobachtungen, die eine verschiedene Auflösbarkeit der Krebszellen durch normales Serum und durch Krebsserum fordert, kann nur durch eine peinlich genaue Anwendung der ursprünglichen Technik⁴ geprüft werden. Eine solche direkte Prüfung des Phänomens der Karzinolyse ist von verschiedenen Seiten unternommen worden, hat aber oft zu Resultaten geführt, die mit einander in scharfem Widerspruch stehen: Ein Teil der Autoren konnte die Richtigkeit der Grundbeobachtung von FREUND und KAMINER bestätigen, während ein anderer Teil dieselbe entschieden ablehnt.⁵

Unsere anfängliche Absicht¹ ist es gewesen, den biochemischen Mechanismus zu beleuchten, welcher die Grundlage der Karzinolyse bildet; dabei haben wir uns auf die Seite der am meisten erfahrenen Nachprüfer dieser Reaktion gestellt, die eine grundsätzliche Richtigkeit dieses Phänomens anerkennen. Wir sind dabei von der Annahme ausgegangen, dass die Karzinolyse als ein enzymatischer Vorgang zu betrachten ist. Zweifellos beeinflussen auch rein physikalisch-chemische Faktoren den Verlauf der Karzinolyse.^{5, 6} Manche Autoren vertreten auch die Ansicht, dass die FREUND—KAMINER'sche Reaktion in das Gebiet der Immunologie gehört^{5, 7, 8},

¹ EULER, L. HELLER u. C. CURMAN, Dieses Archiv 1, 8, (1949).

² R. WILLHEIM u. K. STERN, Biochem Z. 239, 473 (1931).

³ E. FREUND u. G. KAMINER, Biochem Z. 26, 312 (1910). — Biochem. Grundlagen der Disposition für Karzinom, Wien 1925.

⁴ E. FREUND in: BARRENSCHEEN-WILLHEIM: Die Laboratoriumsmethoden der Wiener Kliniken (Wien 1928) 370.

⁵ Literatur vgl. EULER—SKARZYNSKI, Biochemie der Tumoren. Enke, Stuttgart 1941.

⁶ A. v. WACEK u. E. PESTA, Zschr. f. Krebsforsch. 46, 211 (1937).

⁷ A. KLOPSTOCK u. H. LEHMANN-FACIUS, Klin Woch 7, 1085 (1928).

⁸ Das Geschwulstproblem, herausg. v. K. HINSBERG, Dresden 1942.

da aber der Wirkungsmechanismus der Antikörper immer noch wenig geklärt ist, so fällt vielleicht diese Deutung mit der enzymatischen zusammen.

Die Richtigkeit der Auffassung der Karzinolyse als eines enzymatischen Vorganges mit allen sich daraus ergebenden Möglichkeiten verschiedener mehr oder weniger spezifischer Aktivierungen oder Hemmungen, kann natürlich auf sehr mannigfaltige Art geprüft werden, je nach dem Enzymsystem, dem man die Hauptrolle bei der Auflösung der Krebszellen durch das Serum zuschreiben will. In unserer schon erwähnten vorhergehenden Arbeit dieser Serie¹ haben wir die Resultate von WILLHEIM u. STERN² nachzuprüfen versucht, die einen auffallenden Parallelismus zwischen der lösenden Wirkung verschiedener normaler und karzinomatöser Menschenserum auf Krebszellen und auf die aus ihnen extrahierten Lipoide beschrieben. Die Unterschiede der lipolytischen Wirkungen normaler und karzinomatöser Seren, welche STERN u. WILLHEIM an menschlichen Seren fanden, konnten aber von uns¹ am tierischen Material weder bei Verwendung der von diesen Autoren beschriebenen kolorimetrischen Neutralrotmethodik^{2,9}, noch bei Verwendung der interferometrischen Technik von METTENLEITER¹⁰ bestätigt werden. Es zeigte sich keine auch nur angenäherte Regelmässigkeit im Auftreten einer Auflösung des Lipoidbodenkörpers, und die bei manchen Seren der einen oder der anderen Art auftretende teilweise Lipoidauflösung könnte eben so gut durch ganz unspezifische nichtenzymatische Einflüsse rein physikalisch-chemischer Natur (etwa Unterschiede der Oberflächenspannung des Serums z. B. nach Nahrungsaufnahme o. a.) verursacht sein, — STERN u. WILLHEIM² selbst sprechen übrigens diese Möglichkeit aus.

Wenn man nun in der Fachliteratur nach etwaigen Unterschieden der enzymatischen Aktivität normaler oder karzinomatöser Seren forscht, die zur Erklärung der FREUND—KAMINER'schen Reaktion vielleicht herangezogen werden könnten, so findet man vielfach nur einander grundsätzlich widersprechende Angaben, die wohl in der verschiedenen Technik und Substratwahl ihren Grund haben können, die aber gleichzeitig doch gegen die Existenz wirklich konsistenter enzymatischer Unterschiede zwischen normalen und Tumor-Seren sprechen. Das betrifft in besonders hohem Grade die von den meisten Autoren als für die Karzinolyse direkt verantwortlich angesehenen proteolytischen (katheptischen oder tryptischen) Enzymsysteme (vgl. Monogr.^{5,8}). Mehrere von uns mit Hilfe der Mäuseaszyteskarzinom- oder Jensensarkom-Zellsuspensionen mit der FREUND—KAMINER'schen Zellrechnungstechnik⁴ ausgeführten Karzinolyse-Versuche, bei welchen durch Bebrütung bei verschiedenem pH und mit oder ohne Zusatz vermutlicher Aktivatoren proteolytischer (z. B. Glutathion) oder esterspaltender (Mg^{++} -Ionen) Enzyme die Hypothese der enzymatischen Natur des Phänomens geprüft werden sollte, ergaben keinen nennenswerten Grad der Zytolyse, auch bei Verwendung normaler Seren. Diese Tatsache, die nicht bloss durch einen Mangel des normalen Rattenserums an karzinolytischer Substanz¹¹ erklärt werden kann, da ja auch bei Verwendung mehrerer normaler (nichtkarzinomatöser) Menschenserum keine nennenswerte Auflösung der Zellen beobachtet werden konnte, kann eher durch eine relativ höhere Widerstandsfähigkeit^{7,6} der von uns verwendeten Tumorzellarten etwaigen lytischen Einflüssen gegenüber, im Vergleich mit den menschlichen Krebszellen aus Lebermetastasen erklärt werden. Derartige Befunde lassen aber eine Nachprüfung des grundlegenden Teiles der FREUND—KAMINER'schen Theorie als wünschens-

⁹ R. WILLHEIM u. K. STERN: Wien. klin. Wchschr. 43: 227 (1930); 44: 728 (1931).

¹⁰ M. W. METTENLEITER: Bol. liga contra el Cancer 13: 165 (1938); Nature 145, 305 (1940).

¹¹ R. KRAUS u. E. v. GRAFF: Wien. Klin. Wchschr. 24: 191 (1911).

wert erscheinen, da das ganze Gebäude der karzinolytischen Reaktion mit seinen mannigfaltigen Folgerungen und Deutungen mit der reellen Existenz eines lösenden Effektes des Normalserums auf Krebszellen steht und fällt.

Aus diesem Grunde haben wir auf die weitere Erforschung des enzymatischen Mechanismus der Karzinolyse bis auf weiteres verzichtet und unsere Anstrengungen auf eine Prüfung der allgemeinen Gültigkeit der Grundbeobachtung von FREUND und KAMINER³ konzentriert. Da die Methodik des Zellrechnens mit grossen subjektiven Fehlern behaftet ist^{5, 6}, wollten wir eine weniger subjektive und gleichzeitig mehr empfindliche Methode finden, die nicht nur den „Alles oder Nichts“-Effekte einer völligen Zellauflösung, aber auch feinere Wirkungen des Serums auf die Zellen zu erfassen imstande wäre. Wir haben deswegen an die Untersuchungen von A. HIRSCHFELD¹² angeknüpft, welcher die Wirkung normalen und karzinomatösen Menschenserums auf alkoholfixierte Paraffinschnitte von Karzinomen untersucht und nach 24-stündiger Bebrütung deutliche Färbbarkeitsunterschiede der Präparate je nach der verwendeten Serumart gefunden hat. Wenn man die schon veraltete Terminologie von HIRSCHFELD in die Sprache der heutigen Zytologie übersetzt, können seine Resultate folgendermassen zusammengefasst werden:

Nach der Färbung der mit Serum bebrüteten Tumorschnitte, zuerst mit einem basischen (1 %-iges Malachitgrün, Neutralrot oder Methylenblau) und dann mit einem sauren Farbstoff (Säurefuchsin oder Wasserblau), findet man nach HIRSCHFELD folgendes:

- a. die mit Normalserum behandelten Schnitte verlieren ihre Färbbarkeit durch basische Farbstoffe, während sie durch saure Farbstoffe normal gefärbt werden.
- b. die mit Krebsserum behandelten Schnitte färben sich gut sowohl mit den basischen wie mit den sauren Farbstoffen, d. h. auf dieselbe Weise wie die nicht mit Serum behandelten Tumorzellen. Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Seren, das am einfachsten durch eine Auflösung oder jedenfalls Änderung der für die Absorption basischer Farbstoffe verantwortlichen Zellbestandteile durch das normale Menschenserum erklärt werden kann, legt eine Wirkung des Normalserums auf die Cytoplasma- und Zellkern-Basophilie bedingenden Stoffe, d. h. auf die Zellnukleoproteide¹³ nahe. (HIRSCHFELD selbst spricht noch von saurem resp. basischem „Albumin“.) Durch die vorliegende Arbeit werden die Befunde von HIRSCHFELD und gleichzeitig auch ihre, eben versuchsweise angegebene Deutung mittels einer etwas abgeänderten und teilweise histochemisch besser definierten Technik nachgeprüft.

Experimentelles

Versuchstechnik:

a) *Tumorpräparate*: Anstatt Paraffinschnitten¹² haben wir Ausstrichpräparate zweier Tumorarten verwendet: einerseits des Jensensarkoms der Ratte, andererseits der Ascites-Karzinomzellen der Maus. Diese letzteren wurden vor dem Ausstreichen 6-mal mit Ringerlösung gewaschen, um die angeblich in der Ascites-Karzinom-Flüssigkeit reichlich vorkommenden Schutzkörper¹⁴ möglichst vollständig zu entfernen. Von jedem der beiden Tumoren wurden jedesmal 2 Serien von Ausstrich-Präparaten angefertigt, von denen eine mit Methylalkohol, die andere durch

¹² A. HIRSCHFELD: Arch. de. l'Inst. Prophylact. 8: 207 (1936).

¹³ A. CLAUDE, J. exp. Med. 84, 51 (1946). — E. Opie, Ibid. 84, 92 (1946).

¹⁴ M. WATERMAN, Wien. Med. Wchschr. 85, 405 (1935).

Tabelle I.

Daten über die normalen und Sarkomratten, welche die untersuchten Seren geliefert haben.

Ver- such Nr.	Ratte Nr.	Gesch- lecht	Alter (Monate)	Körper- gewicht (netto) gm	T u m o r			
					Alter (vom Impftage an gerechnet)	Gewicht		Beschaffen- heit
						Gramm	% des Körper- gewichtes	
a) Normalratten:								
1	I	♀	3	122				
	II	♀	4½	177				
2—3	III	♀	4½	142				
	IV	♀	4½	156				
4	V	♂	5½	240				
5	VI	♂	8	276				
6	VII	♂	5½	158				
b) Jensesarkomratten:								
1	(10569) I	♀	3½	103	14 Tage	3,5	3,4	fein
2—3	(10564) II	♀	4½	130	16 »	7	5,4	»
	(10574) III	♀	4½	209	20 »	16	7,6	ein wenig hämor- rhagisch
5	(10588) IV	♀	5	152	13 »	3	2,0	fein
6*	(10590) V	♀	5	150	15 »	5	3,3	hämorrhagisch
c) Benzpyrensarkomratten:								
4	(10371) I	♂	5	255	16 Wochen	55	21,6	teilweise nekro- tisch
5	(10436) II	♂	5	204	9 »	11	5,4	»
6	(10432) III	♂	5	148	9 »	14	9,5	»

* Nur dieses Jenseserum wurde mit den eigenen Tumorzellen bebrütet. Bei allen anderen Versuchen stammten die Jenseseren aus anderen Jensesarkomratten wie die Tumorausstriche.

Erhitzen (3-maliges Ziehen durch eine Bunsenflamme) fixiert wurde. Die Fixierung mit Methylalkohol (nach 3 Minuten Abspülen mit dest. Wasser) diente der nachfolgenden panoptischen Färbung nach PAPPENHEIM (kombinierte MAY—GIEMSA-Färbung, vgl. z. B. 15), während die wärmefixierten Präparate später nach FEULGEN gefärbt wurden.

b) *Bebrütung mit Serum*: Die fixierten, lufttrockenen Ausstriche wurden in ihrer Mitte mit einem Tropfen des geprüften Serums resp. der Kontrollflüssigkeit versetzt und in (mittels Vaseline) luftdicht abgeschlossenen Petrischalen mehrere Stunden bei 37° in einem Wärmeschränk bebrütet.

Das Einlegen chloroform-getränkter Wattebausche in die Petrischalen, d. h. die Durchführung der Bebrütung in einer Atmosphäre von Chloroform-Dämpfen, sollte ein störendes Bakterienwachstum verhindern (mehrmals durchgeführte mikroskopische Kontrolle der verwendeten Seren nach der Bebrütung zeigte eine praktisch

vollständige Abwesenheit von Bakterien). Die Bebrütungszeit betrug in den verschiedenen Versuchen zwischen 3 und 6 Stunden (vgl. Tabelle II).

Nach der Bebrütung wurden die Präparate mit Leitungswasser gewaschen und gefärbt. Die ursprünglich mit Methylalkohol fixierten Ausstriche wurden mit MAY—GRÜNWARD—GIEMSA gefärbt (siehe oben), und die wärmefixierten zuerst 24 Stunden in 96 %-igen Alkohol eingelegt, worauf ihre Färbung nach FEULGEN erfolgte.¹⁵

c. Seren und Kontrollflüssigkeiten: Es wurde in jedem Versuch sowohl das Serum einer Normalratte, wie dasjenige einer oder zweier Jensen- oder Benzpyren-Sarkom-Ratten (mehrmals umtransplantierte Tumoren) verwendet.

Das Geschlecht und das Alter der in jedem Versuch verwendeten Tiere sind in der Tabelle I angegeben. Es scheint keine Beziehung zwischen diesen Faktoren und den Wirkungen der betreffenden Seren zu bestehen.

Als Kontrollen dienten einerseits die unbehandelten, *seitlichen* Partien aller Präparate (Kontrolle der Richtigkeit der Färbung), andererseits die mit Ringerlösung und mit der zentrifugierten, d. h. zellfreien Mäuse-Ascites-Flüssigkeit versetzten Parallelpräparate. Alle Präparate jeder Serie wurden gleichzeitig, d. h. unter genau denselben Bedingungen, gefärbt. Die Ergebnisse der mikroskopischen Beobachtung aller Präparate, die im folgenden Abschnitt eingehend beschrieben und diskutiert werden sollen, sind in der beigefügten Tabelle II in summarischer und der Übersichtlichkeit wegen vereinfachter Form zusammengefasst.

Resultate

1. Das Verhalten der beiden verschiedenen Arten von Tumorzellen (Jensensarkom und Mäuse-Ascites-Karzinom) von denen die ersteren mit den geprüften Rattenseran homolog, die anderen heterolog waren, wurde immer übereinstimmend gefunden. Die festgestellten Änderungen der Färbbarkeit der verschiedenen Zellbestandteile waren für die beiden Arten von Präparaten nach Bebrütung mit demselben Serum bzw. der Kontrollflüssigkeit immer die gleichen. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass die nach Bebrütung mit verschiedenen Seren oder Kontrollflüssigkeiten auftretenden Unterschiede in der Färbbarkeit der Zellen durch verschiedene Wirkungen der einzelnen Seren (bzw. Kontrollflüssigkeiten) und nicht durch Unterschiede der Tumorausstriche selbst bedingt waren.

Die einzige Ausnahme von dieser Regel (in der Tabelle II mit einem Stern versehen) bildet der Versuch Nr. 6, in welchem die beiden Arten von Präparaten nach Behandlung mit dem Serum derselben Sarkomratte, von welcher die Jensensarkom-Ausstriche herstammten, verschiedene Färbbarkeit nach PAPPENHEIM zeigten. Die mit dem eigenen Serum bebrüteten Jensensarkom-Präparate zeigten in diesem Falle keine Änderung der Färbbarkeit ihrer Zellkerne (siehe unten), während die mit demselben Serum bebrüteten Mäuse-Ascites-Karzinom-Zellen deutliche Auflösungserscheinungen aufwiesen. Die FEULGEN-Färbung liess aber keine Unterschiede zwischen den beiden Tumorarten erkennen — für die *Jensensarkomzellen* gaben somit die beiden Färbungsmethoden verschiedene Resultate, was in keinem anderen Falle gefunden worden ist. Die Einmaligkeit eines derartigen Verhaltens macht aber den Einfluss zufälliger Faktoren in dem beschriebenen Falle erwäg-

¹⁵ B. ROMEIS, Taschenbuch d. Mikr. Technik (München—Berlin 1943).

Versuch Nr.	Serum- resp. Kon- trollflüssigkeitsart	Bebrü- tungs- zeit	Ver- dün- nung	R e s u l t a t	
				Z y t o p l a s m a	
				Nuklealfärbung	Panoptische Färbung
1—6	unbehandelt			hellgrün	blaugrau
3	Ringerlösung	3 St.	—	grün, zerflossen	rosa, Zellgrenzen verwischt
4	»	3 »	—	» »	» » »
5	»	4 »	—	» »	» » »
6	»	4 »	—	» »	» » »
1	»	6 »	—	» »	» » »
2	»	6 »	—	» »	» » »
3	Normalserum IV	3 St.	—	grün, zerflossen	rosa, Zellgrenzen verwischt
		3 »	1 : 1	» »	» » »
4	» V	3 »	—	» »	» » »
		3 »	1 : 1	» »	» » »
5	» VI	4 »	—	» »	» » »
		4 »	1 : 1	» »	» » »
6	» VII	4 »	—	» »	» » »
1	» I	6 »	—	» »	» » »
		6 »	1 : 1	» »	» » »
	» II	6 »	—	» »	» » »
		6 »	1 : 1	» »	» » »
	» III	6 »	—	» »	» » »
2	» IV	6 »	—	» »	» » »
		6 »	1 : 1	» »	» » »
3	Jensensarkomserum II	3 St.	—	grün, besser kontu- riert	die meisten Zellen blaugrau, Zell- grenzen deutlicher sichtbar
4	» III	3 »	1 : 1	grün, teilweise zer- flossen	rosa, Zellgrenzen teilweise ver- wischt
5	» IV	3 »	—	grün, zerflossen	rosa, Zellgrenzen verwischt
		4 »	—	» »	» » »
6*	» V	4 »	—	» »	» » »
1	» I	6 »	—	» »	» » »
		6 »	1 : 1	» »	» » »
2	» II	6 »	—	» »	» » »
		6 »	1 : 1	» »	» » »
4	Benzpyrensarkom- serum I	3 St.	—	grün, zerflossen	rosa, die Zellgrenzen verwischt
5	» II	4 »	—	» »	» » »
6	» III	4 »	—	» »	» » »
3	Mäuseasziteskarzi- nom (Zentrifugat)	3 St.	—	grün, ziemlich gut konturiert	ein Teil der Zellen blaugrau, Zell- grenzen ziemlich gut erhalten
4		3 »	—	»	» »
5		4 »	—	grün, zerflossen	rosa, Zellgrenzen verwischt
6		4 »	—	» »	» » »
1		6 »	—	» »	» » »
2		6 »	—	» »	» » »

* Nur in diesem Falle ist ein unterschiedliches Verhalten der beiden Arten von Tumorpräparaten

ler Färbung

Zellkerne

Nuklealfärbung	Panoptische Färbung
rot-violett, streifig, Nukleolus ungefärbt	rötlich-violett, deutlich strukturiert, Nukleolus hellblau.
rot-violett (dunkler), geschrumpft, homogen	dunkel-violett, geschrumpft, Nukleolus ununterscheidbar.
»	»
»	»
»	»
»	»
»	»
»	»
ungefärbt	wie ausgewaschen, nur ein rötliches Gerüst sichtbar.
»	»
rötlich-violett (hell), ein wenig geschrumpft, Nukleolus ununterscheidbar	rötlich-violett, ein wenig geschrumpft Nukleolus ungefärbt.
»	»
fast ungefärbt (schwach rosa)	nur ein rötliches Gerüst sichtbar.
»	»
rot-violett (ziemlich hell)	rötlich-violett, Struktur verwaschen.
ungefärbt	wie ausgewaschen, nur ein rötliches Gerüst sichtbar.
»	»
»	»
»	»
»	»
»	»
»	»
»	»
rot-violett (etwas geschrumpft)	rötlich-violett, ein wenig geschrumpft.
»	»
»	»
ungefärbt	rötlich-violett (sehr hell).
rosa (Struktur undeutlich)	Struktur aufgelockert, aber noch färbbar (hell violett).
fast ungefärbt (schwach rosa)	a) <i>Jensensarkompräparat</i> : (eigenes Serum) dunkel violett, geschrumpft.
»	b) <i>Mäuseasziteskarzinompräparat</i> : Struktur stark aufgelockert, violettes Gerüst.
ungefärbt	wie ausgewaschen, nur ein rötliches Gerüst sichtbar.
»	noch stärker ausgewaschen, Gerüst rosa.
»	wie ausgewaschen, rötliches Gerüst.
»	»
rot-violett, ein wenig geschrumpft	dunkel-violett, ein wenig geschrumpft.
rosa (Struktur verwischt)	Struktur gelockert, aber noch gut färbbar (rötlich-violett).
rot-violett, ein wenig geschrumpft	dunkel-violett, ein wenig geschrumpft.
rot-violett, teilweise streifig	rötlich-violett, Struktur teilweise erhalten, Nukleous ungefärbt.
»	»
»	»
»	»
»	»
»	»

gegenüber demselben Serum beobachtet worden (siehe unter Kernfärbung).

bar, und erlaubt nicht, den gefundenen Unterschied als signifikativ zu betrachten.

Abgesehen von diesem Fall war der Parallelismus zwischen den beiden Tumorarten so vollständig, dass es nicht notwendig erschien, das Aussehen der beiden Arten von Tumorpräparaten gesondert zu beschreiben. Auch die Angaben der Tabelle II beziehen sich (mit der erwähnten Ausnahme) auf die beiden Arten der untersuchten Tumoren.

2. Für die Beurteilung der Spezifität und des untersuchten enzymatischen Charakters der beobachteten Serum-Wirkungen war der Effekt der Einwirkung einer einfachen Ringer-Lösung auf die Präparate von Bedeutung.

Es zeigte sich, dass schon die 3–6 stündige Bebrütung der fixierten Tumorpräparate mit Ringerlösung (pH etwa 7,6) bedeutende Veränderungen im mikroskopischen Aussehen der behandelten Präparat-Teile verursachte. Als Kontrolle dienten die unbehandelten seitlichen Teile der Tumor-Ausstriche. Die beobachteten Einwirkungen der Ringer-Lösung betreffen sowohl das Cytoplasma wie auch die Kerne der fixierten Tumorzellen beider Arten. Die Veränderungen im Cytoplasma waren aber bedeutend stärker und glichen fast vollkommen denen, die nach der Einwirkung des Serums gefunden wurden, während die Zellkerne nach der Bebrütung mit Ringer-Lösung nur wenig verändert erschienen.

a) Aussehen des Protoplasmas nach der Bebrütung mit Ringer-Lösung.

Änderungen der Färbbarkeit des Protoplasmas der behandelten Tumorzellen konnten nur an den panoptisch nach MAY—GIEMSA gefärbten Präparaten untersucht werden, da die salzsaure Hydrolyse bei 60°, die einen Teil der FEULGEN'schen Nuklealfärbung ausmacht, schon an sich so viel tiefgreifende Veränderungen in den meisten Bestandteilen der Zellen verursachen muss, dass die feineren Affinitätsunterschiede gegenüber verschiedenen basischen resp. sauren Farbstoffen nach einer derartigen Behandlung unmöglich unverändert erhalten werden können. Die mit polychromen Farbstoffgemischen (wie MAY—GRÜNWARD oder GIEMSA) direkt gefärbten Tumorpräparate pflegen aber in der Regel einen mässig starken Grad von Basophilie ihrer Zellen zu zeigen, die sich im Falle der PAPPENHEIM'schen (panoptischen) Färbung in einer bläulich-grauen Farbe des Cytoplasmas äussert.

Diese bläulich-graue Farbe des Cytoplasmas der meisten Tumorzellen, die für die seitlichen (unbehandelten) Kontrollpartien unserer Ausstriche oder für ganz frische Ausstriche charakteristisch war, und somit durch blosses Verweilen in einer Chloroform-Atmosphäre nicht beeinträchtigt wird, konnte nach einer mehrstündigen Bebrütung ihre Ausstriche mit Ringerlösung *nicht* mehr beobachtet werden. Das ursprünglich basophile Cytoplasma der Tumorzellen färbte sich nach der Einwirkung der Ringer-Lösung nicht mehr bläulich, sondern schwach rosa (also acidophil) mit dem im Farbstoffgemisch enthaltenen Eosin. Auch die ursprünglich ganz deutlichen rundlichen Umrisse der Tumorzellen erschienen nunmehr ganz verwischt, und das ganze Cytoplasma an den meisten Stellen zu einer zusammenhängenden strukturlosen rosa gefärbten Masse zerflossen.

Ein derartiges Verschwinden der Basophilie mit einer gleichzeitigen Verwaschung der Zellgrenzen legt die Annahme eines lösenden Einflusses der Ringer-Lösung auf das Zellprotoplasma, bzw. auf gewisse Bestandteile desselben nahe. Dabei kommen in 1. Linie die für die Basophilie des Cytoplasmas vieler Zellen verantwortlichen Ribonukleoproteide¹³ in Frage. Man könnte sich etwa vorstellen, dass die cyto-

plasmatischen Pentose-Nukleoproteide entweder durch die Ringerlösung direkt ausgewaschen werden, wie bei der Chromosin-Technik von MIRSKY und POLLISTER¹⁶, oder auch, dass die Fixierung der Präparate mit dem Methanol eine Aufspaltung der Nukleinsäure-Protein-Bindung auf dem Wege einer Denaturierung des Protein-Anteiles verursacht, wobei die frei gewordene Nukleinsäure ohne weiteres durch die nahezu neutrale Ringerlösung weggespült wird.

b) *Aussehen der Zellkerne nach der Bebrütung mit Ringer-Lösung.*

Die Einwirkung der Ringerlösung auf das Aussehen und die Färbbarkeit der Zellkerne der Tumorausstriche war, wie erwähnt, viel schwächer als auf das Cytoplasma. Sie äusserte sich in einer regelmässig auftretenden Schrumpfung der Kerne, die sowohl auf den panoptisch wie auf den nach FEULGEN gefärbten Präparaten deutlich sichtbar war. Diese Schrumpfung, wahrscheinlich osmotischer Natur, hatte eine starke Verwischung der inneren Zellstruktur zur Folge. Die Kerne erschienen mehr homogen und wegen der durch die Schrumpfung verursachten grösseren Konzentrierung ihrer färbbaren Substanz (des Chromatins) auch stärker gefärbt, als an den seitlichen Kontrollpartien der Präparate. Die in den Kontrollpartien deutlich blau gefärbten Nukleolen (panoptische Färbung) konnten nach der Bebrütung mit Ringerlösung nicht mehr gefunden werden, auch nicht an den relativ weniger geschrumpften Teilen; an ihrer Stelle traten runde ungefärbte Löcher auf.

Dagegen konnte man nach der Einwirkung der Ringer-Lösung keine Beeinträchtigung der Färbbarkeit des Kern-Chromatins finden, die Kerne erschienen auf Grund ihrer Schrumpfung sogar dunkler d. h. stärker gefärbt als bei den Kontrollen. Ein Verlust an färbbarem Material konnte somit in diesem Falle (wenigstens qualitativ) cytologisch nicht festgestellt werden.

3. Die Resultate der Einwirkung normaler und sarkomatöser Rattenserum auf die fixierten Tumorausstriche können nur auf dem Hintergrund der oben beschriebenen unspezifischen Veränderungen im Aussehen der Zellen nach einer Bebrütung mit einer der einfachen „physiologischen“ Salzlösungen analysiert werden. Die von uns dabei verwendeten Rattenserum wurden teilweise unverdünnt, teilweise mit dem gleichen Volumen Ringerlösung (1 : 1) verdünnt mit den Präparaten bebrütet (Vgl. Tabelle II), um die Behauptung einiger Autoren¹⁷ zu prüfen, nach welcher gewisse enzymatische Wirkungen des Serums erst nach der Verdünnung dieses letzteren sichtbar werden, und zwar wegen der vermutlichen Gegenwart inhibierender Stoffe, die bei höherer Konzentration das Enzym durch eine starke Absorption an seiner Oberfläche blockieren sollen.

a) *Einwirkung des normalen und sarkomatösen Rattenserums auf das Cytoplasma der fixierten Tumorzellen.*

Das Cytoplasma der mit beiden Arten von Serum behandelten und dann gefärbten Tumorzellen zeigte im allgemeinen dasselbe Aussehen wie nach der Behandlung mit Ringerlösung. In beiden Fällen verlor es seine Basophilie und zerfloss in unförmliche, rosa gefärbte Massen. Die Wirkung des Rattenserums auf das Cytoplasma der fixierten Tumorzellen muss somit als unspezifisch bezeichnet werden, und be-

¹⁶ A. E. MIRSKY u. A. W. POLLISTER, J. Gen. Physiol. 30, 117 (1946).

¹⁷ H. KLEINMANN u. G. SCHATT, Biochem. Z. 252, 145 (1932).

ruht wahrscheinlich auf einer rein physikalischen Auflösung gewisser durch die Fixierung anscheinend unlöslich gemachten Bestandteile.

Die einzige Ausnahme bildete ein mit unverdünntem Serum von Jensensarkomratten 3 Stunden lang bebrütetes Präparat, bei dem eine teilweise Erhaltung der Cytoplasma-Basophilie und der Zellgrenzen gefunden wurde. Diesem Befund kann aber wegen seiner Einmaligkeit noch keine prinzipielle Bedeutung zugeschrieben werden. (Jensenserum II der Tabelle II.)

b) Einwirkung des normalen und sarkomatösen Rattenserums auf die Zellkerne der fixierten¹⁸ Tumorzellen.

Bei der Beurteilung der in der Tabelle II zusammengefassten Wirkung der geprüften Seren auf die Zellkerne der fixierten Tumorzellen muss zuerst der Einfluss der Bebrütungszeit auf den beobachteten Effekt berücksichtigt werden.

Das Verhalten der einzelnen Seren bei relativ kurzer (3 oder 4 stündiger) Bebrütung, d. h. in den Versuchen 3–6, war wenig einheitlich, aber die Unterschiede schienen von normal resp. Sarkom-Charakter des Serums unabhängig zu sein. Vier der verwendeten Seren (Normalserum, IV und VI und Jensensarkomseren III und V) hatten einen stark lösenden Einfluss auf die Zellkerne der Tumorausstriche. Dieser *kariolytische Effekt*, der alle Tumorzellen der beiden Tumorarten betraf, mit der Ausnahme der kleinen, chromatinreichen Asciteskarzinomzellen des Typus IV von SEEGER¹⁹, äusserte sich bei der FEULGEN'schen Nuklearfärbung, in einem völligen Verlust der Färbbarkeit der Kerne. Bei panoptischer Färbung verschwand die Färbbarkeit der Zellkerne zwar nicht vollständig, aber es trat eine sehr starke Auflockerung ihrer Struktur und eine Abnahme und Änderung der Färbbarkeit ihrer erhaltenen Reste ein. Die Zellkerne sahen wie ausgewaschen aus, und das aus ihnen erhalten gebliebene fadenartige Gerüst, das vielleicht den Rest-Chromosomen von MIRSKY und RIS²⁰ entsprach, färbte sich jetzt rötlich, d. h. acidophil. Die Maschen dieses Gerüsts waren ganz ungefärbt und erschienen aus diesem Grunde leer.

Andere, gleich lange mit den Ausstrichen bebrütete Seren beider Arten zeigten aber die oben erwähnten Veränderungen entweder überhaupt nicht (Normalserum V, Jensenserum II und Benzpyrenseren I und III) oder nur in schwächerem Grade, wobei die mikroskopischen Bilder sich einmal mehr dem einen, ein anderes Mal dem anderen Extrem näherten. Die nach den beiden Färbungsmethoden gefärbten Präparate stimmten dabei für jedes Serum recht gut miteinander, was einen Beleg dafür liefert, dass die beobachteten Veränderungen wirklich durch die Eigenschaften der einzelnen Seren und nicht durch eine unregelmässig auftretende Autolyse der Kerne bedingt waren. Das bisher geprüfte Material (vier Normalseren und sieben Tumorseren in dieser Gruppe — Versuche 3–6) ist noch nicht gross genug um eine evtl. vorhandene Abhängigkeit des Auftretens oder der Intensität des beschriebenen kariolytischen Effektes verschiedener Rattenserum von gewissen Eigenschaften der Versuchstiere (Alter, Geschlecht, usw.) nachweisen zu können, aber schon eine oberflächliche Betrachtung der Tabelle II zeigt, dass von einem grundlegenden Unterschied der Wirkung normaler und sarkomatöser Rattenserum auf fixierte Tumor-

¹⁸ Wie an anderer Stelle näher angegeben wird, zeigen die frischen, nicht fixierten Zellen im Wesentlichen das gleiche Verhalten.

¹⁹ P. G. SEEGER, Arch. Exp. Zellforsch. 22 356 (1938/1939). — Die Zellen des Typus IV werden übrigens von manchen Autoren für abgestorbene Zellen angesehen.

²⁰ A. E. MIRSKY u. A. RIS, J. Gen. Physiol. 31, 1 (1947).

zellen, wie von A. HIRSCHFELD¹² für menschlichen Krebs gefunden wurde, nicht die Rede sein kann, und zwar schon aus dem Grunde, dass auch ein Teil der Normalseren keinen karyolytischen Effekt zeigt, (Normalserum V).

Dass das eben beschriebene unterschiedliche Verhalten verschiedener Seren bei kurzer Bebrütung wahrscheinlich nicht auf einem völligen Mangel einzelner Seren an einem lösenden Faktor beruht, scheint aus den Versuchen 1 und 2 hervorzugehen, wo die Bebrütungszeit 6 Stunden betrug. Bei diesen Versuchen haben wir in allen Fällen sowohl bei den vier geprüften Normalseren, wie auch bei den zwei Jensensarkomseren einen starken lösenden Effekt auf die Zellkerne der Tumorzellen beobachtet. Eine längere Bebrütung scheint somit für das Zustandekommen des voll ausgeprägten karyolytischen Serumeffektes von Wichtigkeit zu sein.

4. Die Bebrütung der Tumorausstriche mit dem zellfreien Zentrifugat der Mäuse-Ascites-Karzinomflüssigkeit ergab im Prinzip etwa dasselbe Bild, wie die Behandlung mit Ringerlösung, und dies sowohl bei 3 resp. 4 als bei 6 stündiger Behandlung. Die Schrumpfung der Tumorzellen und ihrer Kerne war aber hier etwas weniger ausgeprägt und die Zellgrenzen waren deutlicher unterscheidbar. Nach 3 stündiger Bebrütung war auch die Basophilie des Cytoplasmas der Tumorzellen noch teilweise erhalten (Versuche 3 und 4), sie verschwand aber nach längerer Bebrütung. Der Umstand, dass die Behandlung mit Ascites-Flüssigkeit, sowohl die mit ihr homologen Ascites-Karzinom-Zellen wie auch die heterologen Jensensarkom-Zellen am wenigsten verändert, *macht die Annahme einer gewissen Schutzwirkung dieser Flüssigkeit auf die Tumorzellen nicht unwahrscheinlich*. Eine solche Annahme würde in gutem Einklang stehen mit den in der Literatur angegebenen Befunden, dass die Tumor-Ascites-Flüssigkeiten reich sind an einem antilytischen Faktor.¹⁴

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Bebrütung fixierter Tumorausstriche mit normalen und sarkomatösen Rattenserum hat bei genügend langer Bebrütungszeit (6 Stunden) regelmässige und sehr charakteristische Veränderungen in der Färbbarkeit der *Zellkerne* der behandelten Tumorpräparate zur Folge.

Diese Veränderungen, die auf einem Verlust der Färbbarkeit nach FEULGEN und auf einem teilweisen Verlust der Färbbarkeit nach MAY—GRÜNWARD und GIEMSA beruhen, werden nur von den Seren, aber nicht von der Ringerlösung oder von der zellfreien Mäuse-Ascites-Karzinomflüssigkeit hervorgerufen. Dieser Verlust der Färbbarkeit beruht wahrscheinlich auf der enzymatischen Einwirkung des Serums auf die *Desoxyribonukleinsäuren* der Zellkerne.

2. Im Gegensatz hierzu sind die lösenden Effekte des Serums auf das *Cytoplasma* der fixierten Tumorzellen *nicht für das Serum spezifisch*; sie werden nämlich auch nach Bebrütung mit Ringerlösung beobachtet.

Stockholm, Universität, Institut für organ.-chem. Forschung und Vitamininstitut.

Tryckt den 18 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

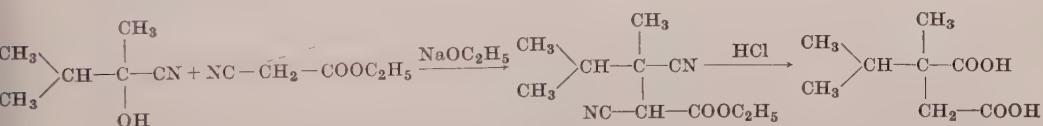
α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and β -methylterebic acid

By JERKER PORATH

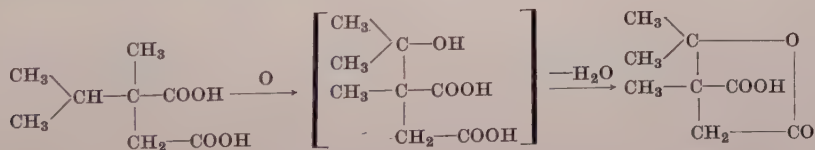
With 3 figures in the text

Investigations — which are in progress at this institute — into the steric relations between certain aliphatic compounds and terpenes involve the necessity of synthetizing both the racemic and the active forms of α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and β -methylterebic acid (β , γ -dimethyl- β -carboxy- γ -valerolactone). Via these acids the aim is to correlate the antipodes of known configuration of isopropylsuccinic acid (1) with camphoronic acid. The configuration at the asymmetric carbon atom in (—)-camphoronic acid, which is obtained as a decomposition product when (+)-camphor is oxidized, is the same as at C₁ in (+)-camphor.

α -methyl- α -isopropylsuccinic acid, which to my knowledge has not been described in the literature, was produced from methylisopropylketonecyanhydrin and cyanacetic ester according to HIGSON and THORPE's method for dialkylated succinic acids (2):



β -methylterebic acid was obtained by oxidizing α -methyl- α -isopropylsuccinic acid with chromium trioxide:



The α -methyl- α -isopropylsuccinic acid was resolved into the antipodes. A melting point diagram (fig. 1) of mixtures of the antipodes demonstrates that the inactive acid is a true racemic compound. The very pronounced maximum suggests that quasi-racemic compounds would easily form between active acid and structurally similar compounds having opposite configuration. (+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and (—)-isopropylsuccinic acid form a molecular compound, the ratio between the components being 1:1 (fig. 2; the composition expressed in

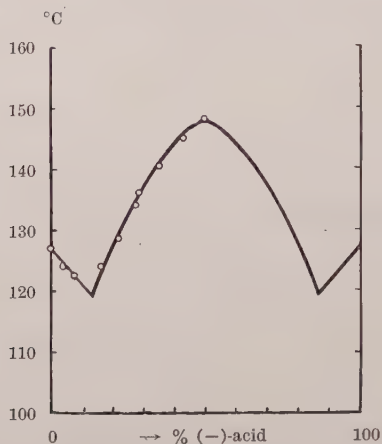


Fig. 1. (+)- and (-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid.



Fig. 2. (+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and (-)-isopropylsuccinic acid.

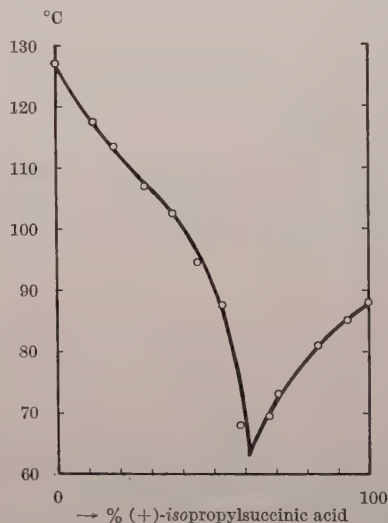
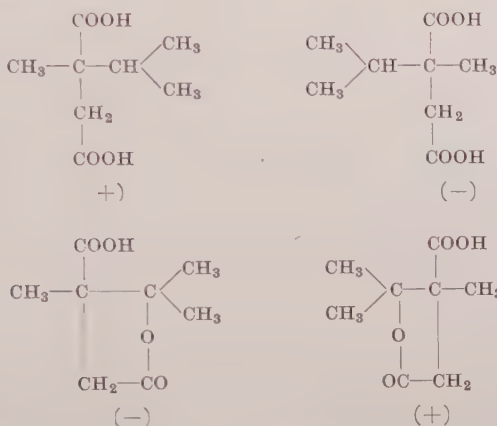


Fig. 3. (+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and (+)-isopropylsuccinic acid.

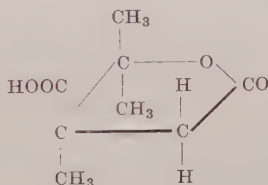
mol %). Since (+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid forms a eutectic mixture (fig. 3) with the other antipode of isopropylsuccinic acid, it is justifiable to assume that the molecular compound is a quasi-racemic compound, the formation of which being due to the same sterical factors as cause the formation of the true racemic compound.

Oxidation of active methylisopropylsuccinic acid gave rise to active β -methylterebic acid with the opposite mode of rotation — in analogy with FREDGA's finding concerning terebic acid (3). The centre of asymmetry is unaffected by the oxidation, so a configurational change need not be feared.

As the configuration of the antipodes of *isopropylsuccinic acid* is determined (1), the steric relations can be illustrated by the following formulae, expressed according to FISCHER's convention:



(-)- β -methylterebic acid may be perspectively represented as follows:



Experimental

α -methyl- α -isopropylsuccinic acid

rac- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid

In a dry flask 10 g sodium was dissolved in 200 ml ethanol and 50 g cyanacetic ester was then added, followed by 50 g methylisopropylketonecyanhydrin¹ under violent turbination.² A slight drop in temperature occurred, but the temperature soon rose again and the contents in the flask became slightly yellow and fluid. The flask was refrigerated for 4 days. The reddish-yellow contents of the flask, from which the condensation product had precipitated, was acidified with dilute hydrochloric acid in small portions. When the solution had become slightly acid (tested with litmus) the water phase was separated. To the ester

¹ Methylisopropylketonecyanhydrin was produced from methylisopropylketone. The latter compound was in turn produced according to two methods: either from amylene hydrate (4), or catalytically by passing a mixture of acetic acid and *isobutyric acid* over pumice stone impregnated with titanium dioxide at approx. 400° (5).

² It is essential that the reacting compounds are carefully free from water, for even minute quantities of hydroxyl ions strongly catalyze the hydrolysis of the cyanhydrin, resulting in a yield of half or less of that given here.

phase was added 100 ml ether, two layers being formed. The upper layer was saved, washed with 100 ml water, 25 ml 2-*N* sodium carbonate solution, and lastly with 50 ml water. The ester-ether solution was dried with calcium chloride. The ether was distilled off at ordinary pressure and the ester was fractionated *in vacuo*. The fraction between 160—162° at 10 mm was collected. The ester, ethyl 2,3-dimethyl-1,2-dicyanobutane-1-carboxylate is a colourless, nonodorous fairly viscous liquid. Yield: 46 g (51 % on a cyanhydrin basis).

46 g cyanester was hydrolyzed on an oil bath with 600 ml of a mixture of equal parts of concentrated hydrochloric acid and water. After 24 hours the hydrochloric acid was distilled off. The solid residue was powdered and thoroughly extracted with ether. The ether was dried with anhydrous sodium sulphate, decolourized with norite, filtered and evaporated. The oily, crude product was dissolved in 50 ml boiling water. On cooling the acid crystallized out in white prisms. After 3 recrystallizations 16.3 g pure acid was obtained. Some additional acid was obtained by evaporating the mother liquors and distilling the anhydride *in vacuo* (130—140°, 15 mm). The anhydride was boiled in water for some minutes, pure acid crystallizing out on cooling. On heating the acid tended to convert into anhydride in the vicinity of the melting point. In order to obtain reproducible results for both the racemic acid and the antipodes the melting point tube was introduced into the apparatus about 10° below the melting point. The temperature was raised by about 2° per minute. The melting point registered in this way lay between 148—149°.

Analysis 0.1384 g acid: 15.21 ml 0.1041-*N* NaOH

0.03567 g acid: 0.07208 g CO₂ and 0.02587 g H₂O

	E. W.	C	H
$C_8H_{14}O_4$ calc.	87.1	55.2	8.10
found	87.4	55.1	8.12

Preliminary resolution experiments

Cinchonidine formed a readily crystallizing salt containing predominantly (+)-acid. Cinchonine was added to the acid liberated from the mother liquor, yielding a salt which was used to obtain (—)-acid. These two salts were employed for the resolution. The quinine salt of the (+)-acid in methanol and particularly its brucine salt in acetone are less soluble than the corresponding salts of the (—)-acid in the same solvents. The strychnine salt is almost insoluble in either hot or cold water; nor was quinidine suitable for resolution.

(+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid

12 g acid and 20 g cinchonidine were dissolved in separate lots of 150 ml ethanol. The solutions were then mixed and refrigerated overnight. The crystal masses were filtered off, dried, weighed and dissolved in 300 ml ethanol. This solution was then refrigerated for 24 hours, white needles crystallizing out. The procedure was repeated 4 times. Each time 0.5 g of the dried salt was taken to determine the rotation in an aqueous solution of the liberated acid. The following series of crystallizations was obtained:

Crystallization	1	2	3	4	5
g dried salt	18.1	14.7	12.9	11.9	10.1
$(\alpha)_D^{25}$	+ 8.0°	+ 10.1°	+ 11.9°	+ 12.4°	+ 12.5°
<i>Analysis</i>	0.1237 g salt:		6.55 ml N ₂ (745.8 mm Hg, 21.5° C)		
	C ₈ H ₁₄ O ₄ , C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O		N calc. 5.98 found 6.02		

The acid was isolated from 9.6 g salt in the usual manner, with dilute sulphuric acid and subsequent ether extraction. The ether having been evaporated 3.2 g crude product was obtained. The acid was 3 times recrystallized from 10 ml water but the rotation did not change noticeably. 2.3 g pure acid was obtained. No quite sharp melting point could be registered, so the melting point was determined as for the racemic acid and found to lie between 126.5—127°. The acid crystallized from an aqueous solution in colourless laminae or prisms (probably monoclinic).

0.1593 g (+)-acid: 17.55 ml 0.1037-*N* NaOH
C₈H₁₄O₄ E. W. calc. 87.1 found 87.5

0.1866 g (+)-acid dissolved in water to 10.00 ml: $2\alpha_D^{25} = + 0.466^\circ$
 $[\alpha]_D^{25} = + 12.5^\circ$; $[M]_D^{25} = + 21.8^\circ$

0.1572 g (+)-acid dissolved in ethanol to 10.00 ml: $2\alpha_D^{25} = + 0.600^\circ$
 $[\alpha]_D^{25} = + 19.1^\circ$; $[M]_D^{25} = + 33.2^\circ$

0.1836 g (+)-acid neutralized with NaOH and diluted with water to 15.00 ml:
 $2\alpha_D^{25} = + 0.035^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = + 1.4^\circ$; $[M]_D^{25} = + 2.5^\circ$

(-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid

The acid was liberated from the mother liquor after crystallization 1 of the cinchonidine salt. 3.5 g strongly levorotatory acid was obtained ($[\alpha]_D^{25} = -10.0^\circ$). 3.4 g of this acid and 8.0 g cinchonine were dissolved in acetone, 30 ml water was added and the solution was heated to boiling. Plates were deposited when crystallization once had been initiated.¹ The brown solution was filtered and the acid liberated. The acid was allowed to react with a new lot of cinchonine, etc., three times. The following series of specific rotations was obtained:

-10.0°; -11.1°; -12.2°; -12.5°; -12.6°

Analysis 0.1412 g salt: 7.48 ml N₂ (745.8 mm Hg, 21.5° C)
C₈H₁₄O₄, C₁₉H₂₂N₂O N calc. 5.98 found 6.03.

1.23 g acid was obtained from 3.9 g salt. The acid was recrystallized twice from 5 ml water, the rotation remaining unchanged. The yield of acid was 0.87 g. Slow crystallization yielded large colourless prisms having the same appearance as the (+)-acid.

0.1614 g (-)-acid: 17.86 ml 0.1037-*N* NaOH
C₈H₁₄O₄ E. W. calc. 87.1 found 87.2

0.1179 g (-)-acid dissolved in water to 10.00 ml: $2\alpha_D^{25} = - 0.297^\circ$
 $[\alpha]_D^{25} = - 12.6^\circ$; $[M]_D^{25} = - 21.9^\circ$.

¹ The initiating crystal was obtained by producing on a small scale secondary cinchonine salt from carefully purified cinchonine and racemic acid. The sticky product first formed crystallized after some days.

β -methylterebic acid

β -methylterebic acid was produced from α -methyl- α -isopropylsuccinic acid in analogy with FREDGA's modification of LAWRENCE's method for terebic acid synthesis (3).

rac- β -methylterebic acid

7 g *rac*- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid, 20 g chromium trioxide, 100 ml water and 18 ml concentrated sulphuric acid were heated for 30 hours on a boiling water bath. The product of the reaction was refrigerated. After 3 days the crystals were filtered with suction. 3.1 g of crude product, coloured by chromium salts, was obtained. The crude product was recrystallized from 20 ml 0.01-*N* sulphuric acid. After another 2 recrystallizations, each from 20 ml water, the yield was 2.37 g pure acid in the form of white needles. The acid melts at 204–205°, generating carbon dioxide. β -methylterebic acid is difficult to dissolve in cold water but fairly easily soluble in hot water. Acetone, ethyl acetate and ethanol are excellent solvents. The acid is moderately soluble in methanol whereas it is almost insoluble in ligroine and benzene.

Analysis 0.1438 g acid: 8.37 ml 0.1000-*N* NaOH

0.02929 g acid: 0.06020 g CO₂ and 0.01848 g H₂O

		E. W.	C	H
C ₈ H ₁₂ O ₄	calc.	172.2	55.8	7.03
	found	171.8	56.1	7.07

A sharp colour change at the equivalent point was obtained in the titration (phenolphthalein). Just as in the case of terebic acid there were no signs of an opening of the lactone ring (3).

(–)- β -methylterebic acid

5 g pure (+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid, 12 g chromium trioxide, 80 ml water and 15 ml concentrated sulphuric acid were heated in a flask as described above. 2.5 g crude product was obtained which was recrystallized from 20 ml 0.01-*N* sulphuric acid and twice from 20 ml water, the resultant prismatic crystals weighing 1.51 g. M. p. 218–221°.

0.1521 g (–)-acid: 8.41 ml 0.1041-*N* NaOH

C₈H₁₂O₄ E. W. calc. 172.2 found 172.3

0.3476 g (–)-acid dissolved in acetone to 10.00 ml:

$2\alpha_D^{25} = -2.675^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -38.5^\circ$; $[M]_D^{25} = -66.3^\circ$.

(+)– β -methylterebic acid

3 g about 90 % (–)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid ($[\alpha]_D^{25} = -10.2^\circ$) was oxidized with 5 g chromium trioxide, 40 ml water and 10 ml sulphuric acid. After heating for 40 hours the solution was as in the former case refrigerated for 3 days. 1.30 g acid was obtained. The acid was recrystallized once from 0.01-*N* sulphuric acid and 4 times from water, 20 ml solvent being used each time. (+)- β -methylterebic acid was in appearance exactly similar to its antipode. M. p. 218–220°.

0.3032 g (+)-acid: 16.89 ml 0.1041-*N* NaOH $C_8H_{12}O_4$ E. W. calc. 172.2 found 172.50.2597 g (+)-acid dissolved in *acetone* to 10.00 ml: $2\alpha_D^{25} = +1.998^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = +38.5^\circ$; $[M]_D^{25} = +66.2^\circ$.

Melting point diagrams

Since, as emphasized earlier, the components close to the melting point are slowly converted into anhydride, the melting points were determined as described in the foregoing for the pure acids. RHEINBOLDT's method (6) and FRIEDRICHS' melting point apparatus were used (7).

Table 1.

(+) and (-)- <i>α</i> -methyl- <i>α</i> -isopropylsuccinic acid	
% (-)-compound	melting point
0.0	127.0°
3.8	124.0°
7.6	122.5°
16.3	124.0°
22.0	128.5°
27.8	134.0°
28.7	136.0°
35.4	140.5°
43.1	145.0°
49.5	148.0°

Table 2.

(+) <i>α</i> -methyl- <i>α</i> -isopropylsuccinic acid and (-) <i>α</i> -isopropylsuccinic acid	
% <i>α</i> -isopropylsucc. acid	melting point
0.0	127.0°
6.9	122.5°
11.8	118.5°
17.9	117.0°
24.3	113.5°
29.8	109.0°
36.5	106.0°
40.3	106.5°
51.4	107.5°
53.6	107.0°
61.9	106.0°
71.0	102.0°
77.1	95.0°
83.9	87.0°
91.7	81.5°
94.8	85.0°
100.0	88.0°

Table 3.

(+) <i>α</i> -methyl- <i>α</i> -isopropylsuccinic acid and (+) <i>α</i> -isopropylsuccinic acid	
% <i>α</i> -isopropylsucc. acid	melting point
0.0	127.0°
12.1	117.5°
18.6	113.5°
28.3	107.0°
37.3	102.5°
45.1	94.5°
53.1	87.5°
58.1	68.0°
68.7	69.5°
71.0	73.0°
83.7	81.0°
93.4	85.0°
100.0	88.0°

SUMMARY

α -methyl- α -isopropylsuccinic acid was synthesized from ethyl 2,3-dimethyl-1,2-dicyanobutane-1-carboxylate and resolved into the optical antipodes. By oxidation with chromium trioxide in diluted sulphuric acid these acids were converted into inactive and active methylterebic acid. The configuration of the components of α -methyl- α -isopropylsuccinic acid, and consequently of β -methylterebic acid, was established by means of melting point diagrams.

Professor ARNE FREDGA had the kindness of putting the active *isopropylsuccinic acids* at my disposal. I take this opportunity of expressing my sincere gratitude for this and for his valuable advice and help. The expenses involved by this investigation were defrayed by a grant from the Nobel Fund of the Royal Swedish Academy of Sciences (Kemiska prisgruppens särskilda fond).

Organic Department, Chemical Institute, University of Uppsala, May 1949.

REFERENCES. 1. A. Fredga and E. Leskinen, Arkiv f. Kemi, Min. o. Geol. Bd 19 B, No 1 (1944). — 2. A. Higson and J. F. Thorpe, J. Chem. Soc. (London) 89, 1455 (1906). — 3. A. Fredga, Festskrift tillägnad E. Hägglund (Svensk Papperstidning (91) 1947). — 4. Org. Synth. 13, 68 (1933). — 5. J. B. Senderens, Bull. Soc. Chim. France [4] 7, 646 (1910). — 6. H. Rheinboldt, J. Prakt. Chem. [2] 111, 242 (1925). — 7. F. Friedrichs, Z. angew. Chem. 34, 61 (1921).

Tryckt den 18 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Effect of sea-urchin egg jelly-coat solution and calcium ions on the oxygen uptake of sea-urchin sperm

By ERIK VASSEUR

With 3 figures in the text

Sea-urchin egg-water, *i. e.* sea-water which has been in contact with normal eggs, causes homologous sperm to agglutinate and increases their motility (1). These two different actions of egg-water have been shown by various authors to depend on different principles, but the exact nature of neither of these agents is known with certainty. Whereas the agglutinating substance is probably a protein-carbohydrate complex of high molecular weight (cf. 2), the activating effect on the sperm motility seems to depend on more than one substance (cf. 3, 4), for example, one which is retained by a cellophane bag and one which is volatile.

These effects of the egg-water are given also by the solution of the sea-urchin egg jelly coat (cf. 4). Since the observation of changes in the sperm motility is a very subjective one, it was thought that measurements of oxygen uptake of sperm suspensions with and without additions of jelly solution, etc., might be helpful for a study on the natural activating agents of sperm motility. The experiments described here are to be continued and a more thorough discussion of these and other results will be given in a later publication.

Material and methods

The Warburg manometrical experiments were performed at the temperature of the running sea-water of the Zoological Station. For the experiments with *Strongylocentrotus droebachiensis* in February–March, the temperature was 3.8°–4.8°. In April–May, for the experiments with *Echinus esculentus*, the temperature ranged between 7.7° and 9.5°. With *Psammechinus miliaris* during the summer the temperature was 15°–19°. These temperatures are well within the physiological range for the different species (5). During each experiment the temperature usually was constant within some tenths of a degree.

The concentrated “dry” sperm was collected in the usual way by filtering through bolting silk. The jelly-coat solutions were prepared according to Vasseur (6). Their content of high-molecular dry substance was about 0.01–0.05 per cent.

Conical Warburg vessels with two sidearms, containing the test solutions, and a central cup, containing 10 per cent potassium hydroxide solution, were used. A sperm concentration of 0.4 ml dry sperm in 2.4 ml final volume was found to be most convenient for these species and for this design of Warburg apparatus. For the experiments with *S. droebachiensis*

1.4 ml sea-water was pipetted into the main compartment and 0.4 ml dry sperm was added as the last constituent before the vessels were immersed in the water bath. For the experiments with *E. esculentus* and with *P. miliaris*, however, a mixture of two parts of dry sperm and seven parts of sea-water was pipetted into the main compartment with a syringe, calibrated to 1.8 ml. This procedure gave more even results and was quicker. Only 10–15 minutes elapsed between the preparation of the mixture and the immersion in the water bath. Before the first reading the vessels were shaken, sometimes only for 15 minutes and sometimes for more than one hour. A longer period of shaking before the first reading seems to be preferable in order to obtain even results.

In most experiments with *E. esculentus* and *P. miliaris* the tipping was done 60 minutes after the first reading, with *S. droebachiensis* after 90 minutes. Thus, the respiration of the sperm in sea-water could be compared between the different vessels during the period before the tipping. In most cases the respiration rate was very even. In order to obtain as comparable results as possible after tipping, a mean value for all vessels was taken for the uptake of oxygen at the time of tipping, and the values for the different vessels were corrected for this.

Experimental

A. Increasing effect on oxygen uptake of sperm with jelly-coat solution and calcium ions, Figs. 1 and 2.

The oxygen uptake of sperm is increased considerably on addition of a jelly-coat solution. Also, the addition of an excess of calcium ions has a strongly increasing effect.

B. Effect of heat-treatment and hydrolysis of the jelly solution, Fig. 3.

By prolonged heating of a jelly solution (for example, one hour at 95°), the increasing effect on the oxygen uptake is usually intensified. This was demonstrated on all three species. The *E. esculentus* jelly was even subjected to heating in an electric autoclave to 126° (sample 1).¹ The increasing effect on the oxygen uptake was enhanced also after this treatment. The autoclaved jelly solutions did not show any agglutinating action.

E. esculentus jelly solution was also hydrolysed in the autoclave, together with the above mentioned sample (1) (see foot-note 1). To 5 ml jelly solution were added (2) 0.1 ml 0.1 *N* HCl in sea-water, pH 3.0; (3) 0.1 ml *N* HCl, pH 1.8; (4) 2.5 ml *N* HCl, pH 0.5 (glass electrode). After autoclaving there was a fine flocculent precipitate in all these three acid samples. There was no precipitate in sample (1) which was autoclaved without addition of hydrochloric acid. The samples (2) to (4) were neutralised with NaOH and the volume of all four samples and also of the non-autoclaved control (0), 5 ml, was adjusted with isotonic NaCl to 10 ml. In samples (2) and (3) the increasing effect of the jelly solution was enlarged to the same extent as in sample (1) as compared with the untreated jelly solution, sample (0); whereas in sample (4), with the strongest acid, the action was destroyed completely, *i.e.*, the oxygen uptake was of the same magnitude as in the sea-water control; in fact, the curves coincide almost exactly, which is the reason why the sea-water control is not shown in the figure.

¹ The steam started to displace the air 33 minutes after the current was switched on. The vent was closed after 15 minutes steaming and a pressure of 2.5 atmospheres was reached after 10 minutes. The electric current was switched off the minute before and the samples were removed after 44 minutes cooling.

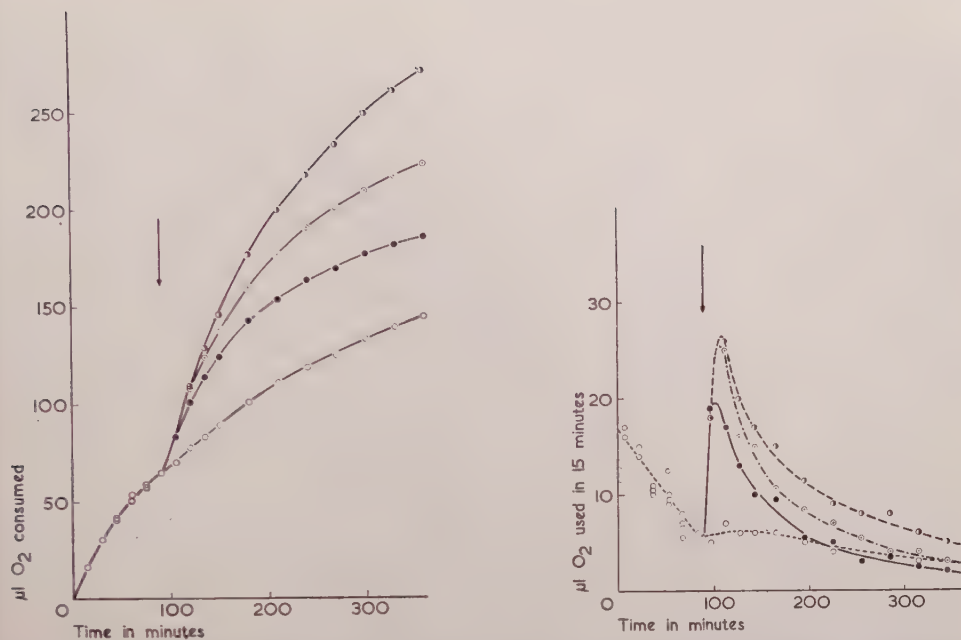


Figure 1 a and b. Effect of jelly solution and calcium ions on oxygen uptake of *Strongylocentrotus droebachiensis* sperm. Tipping after 90 minutes, denoted by arrow, of

- - - - - ○ 0.6 ml sea-water,
- - - - - ○ 0.3 ml jelly solution and 0.3 ml sea-water,
- - - - - ● 0.3 ml isotonic CaCl_2 solution and 0.3 ml sea-water,
- - - - - ● 0.3 ml jelly solution and 0.3 ml isotonic CaCl_2 solution.

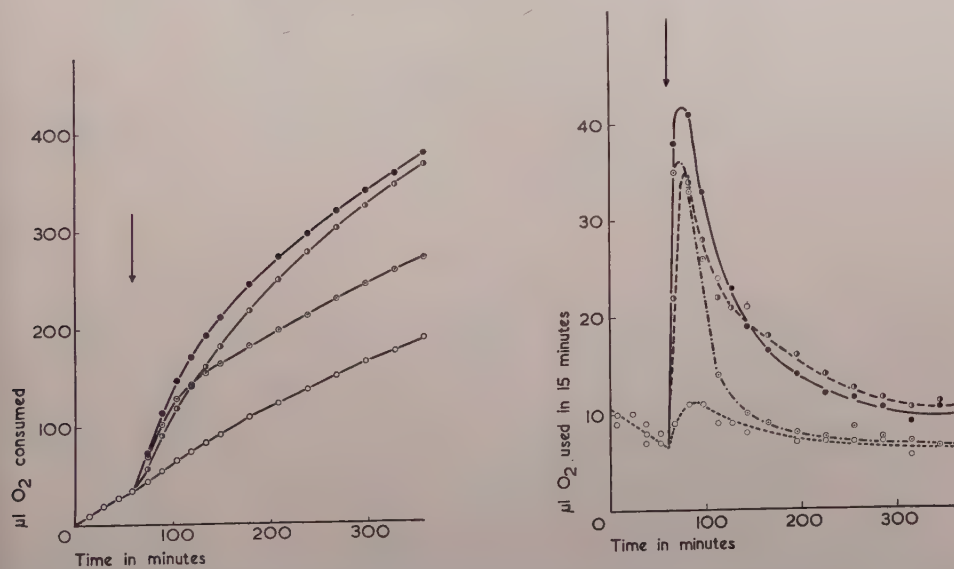


Figure 2 a and b. Effect of jelly solution and calcium ions on oxygen uptake of *Echinus esculentus* sperm. Symbols as in figure 1.

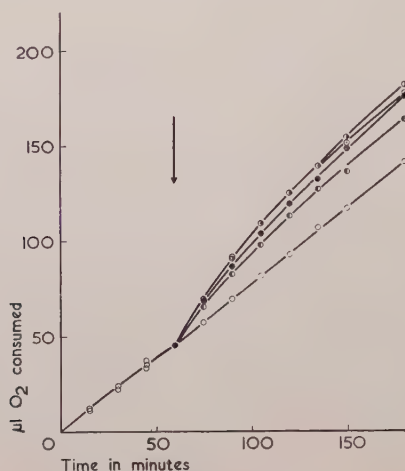


Figure 3. Effect of heat-treatment and hydrolysis of *Echinus esculentus* jelly solution on its increasing action on the oxygen uptake of sperm, see text. ● sample 0, ● sample 1, ● sample 2, ⊙ sample 3, ○ sample 4.

The samples from Fig. 3 were analysed for reducing properties with the Somogyi method (7) and for adjacent hydroxyl groups by periodate oxidation. These and other analyses show that autoclaving alone increases the reducing properties and the periodate oxidation value to the same extent from a very low initial value, samples (2) and (3) giving about the same figures as sample (1), whereas sample (4) showed a further degradation with both methods. These results were confirmed by a similar, more extended experiment with *P. miliaris* jelly and sperm.

The effect of the hydrolysed jelly solution on the oxygen uptake of sperm was studied further with *P. miliaris*. It was shown that the flocculent precipitate obtained on autoclaving at a pH of about 2 had almost no power to raise the oxygen uptake. The clear solution, on the other hand, had the same effect as the original non-centrifuged solution.

Discussion

The oxygen uptake of sperm is increased by various agents. In this paper the effect of calcium ions and jelly solution on this reaction has been studied. The increasing effect of these two agents does not seem to depend on the same mechanism, as can be seen on Figs. 1 and 2. The enhancement with jelly is more instantaneous than the calcium effect. But on the other hand, the latter effect is more persistent.

A very interesting difference between *S. droebachiensis* and *E. esculentus* was found in the behaviour of their sperm towards the combined action of calcium and jelly solution. In *E. esculentus* the effect was additive: the enhancing action was instantaneous and more violent than for calcium or jelly alone and the action persisted nearly as long as with calcium alone. In *S. droebachiensis*

on the other hand, calcium and jelly solution counteracted each other to a certain degree, resulting in a less violent increase with short duration. These differences in reaction were confirmed by experiments with dilution series of jelly solution with and without the simultaneous addition of a certain amount of calcium. In both species the effect without excess of calcium was reduced on diluting the jelly solutions. The same effect was found in *E. esculentus* on addition of calcium chloride, *i. e.*, a better action was obtained with a more concentrated jelly solution than with a less concentrated, but also the diluted jelly solutions gave, in combination with calcium chloride, higher increasing effects than the calcium chloride control. In *S. droebachiensis* on the other hand, the calcium control was always superior in its increasing effect as compared with the combined action of calcium with any jelly solution, a more diluted jelly solution giving a better effect in combination with calcium than a more concentrated under the same conditions. *P. miliaris* seems to behave similarly to *E. esculentus*.

It seems difficult at present to give an explanation for this difference in behaviour, but in this connection the unusually strong enhancing effect of calcium ions on sperm agglutination in *S. droebachiensis* (2) might be taken into consideration.

Analyses (8) on *E. esculentus* jelly solution with known content of high-molecular substance suggest a long-chain structure of the carbohydrate component with one reducing terminal group for 150 monosaccharide (galactose (9)) residues. Autoclaving (as in foot-note 1) of a jelly solution in distilled water increases the amount of reducing groups fivefold, indicating that in the jelly coat *in situ* many reducing groups might be bound to the protein component by a rather loose linkage, perhaps through the ω -amino group of for example lysine (cf. 2, 10). These linkages are then broken up by comparatively mild treatments, some being disconnected already by the acid treatment used for dissolving the jelly, giving rise to free carbohydrate chains. If this assumption is correct, then of course the carbohydrate component consists of shorter chains (about 30 monosaccharide residues). The increasing effect of the jelly solution on the oxygen uptake of sperm may depend on the action of these acid carbohydrate chains. Since they have strongly charged acid groupings, they may act as an irritating agent on the mechanism controlling the movements of the sperm. The motility of the spermatozoa is intensified and for this reaction the oxydative metabolism must be increased, giving a sudden rise in oxygen consumption. By the liberation of more chains — effected, for example, by autoclaving the jelly solution — this action is increased. But of course, the activating agent might also serve purely as nourishment for the sperm. In this case, however, the metabolic enzymes must be well adapted to this substrate, since the effect of the addition of the jelly solution is of very short duration and very active, and since the effect is abolished completely when the substrate is degraded too much, cf. sample (4) in Fig. 3.

Preliminary analyses on the nitrogen content of the clear solution and the precipitate gave a high value for total nitrogen in the clear solution, indicating the possibility that the increasing agent on the oxygen uptake of sperm might be a peptide or an easily hydrolysable basic substance (cf. 11).

The jelly coat of the sea-urchin egg can be dissolved by treatment with slightly acid sea-water (pH usually about 5.3–5.8 (6)). It has been assumed (2)

that the spermatozoa force their way through the jelly coat by means of the acidic action of the respiratory carbon dioxide. In order to test this assumption, some trials were made to dissolve the jelly coat by sea-water which had been saturated to different degrees with carbon dioxide. Sea-water fully saturated with carbon dioxide shows a pH of about 4.8–4.9, depending on the salinity (22–32 ‰). One part CO₂-saturated sea-water mixed with one part normal sea-water has a pH of 5.2–5.3, which is sufficient to dissolve the jelly coat of *P. miliaris* eggs (6). *P. miliaris* egg suspensions were treated with sea-water saturated to different degrees with carbon dioxide. The jelly was in fact dissolved in the more concentrated CO₂ solutions with the limit at about half saturation (pH 5.3).

In this connection, it was interesting to see how CO₂-saturated sea-water would act on *Echinocardium cordatum* jelly, since the upper pH limit for dissolving the jelly of this species is at 5.1 (6). One part *E. cordatum* egg suspension was added to mixtures of CO₂-saturated sea-water and different amounts of normal sea-water. At a pH of about 5.3–5.5 the jelly was swollen enormously, and after further saturation of the suspension with carbon dioxide, the eggs lost their jelly coat. An analogous experiment with hydrochloric acid gave the same results at the same acidities.

These experiments indicate that the view (2) concerning the probable structure of the jelly coat must be changed somewhat. It seems probable that much or even most of the protein component is present in the jelly coat at a rather early stage of jelly development and that the swelling of the jelly is effected to a great extent by the diffusing respiratory carbon dioxide of the egg. It is, however, rather doubtful whether the carbon dioxide will have the power to break the hypothetical linkage between the calcium and the certainly very acid sulphuric acid groups of the carbohydrate. Other linkages probably must exist, which can be dissolved by carbon dioxide. The analyses on autoclaved jelly solution indicate that there really are some linkages in the jelly which are easily broken down (see above).

SUMMARY

1. Calcium ions and jelly-coat solution, both alone and in combined action, give a strong increase in the oxygen uptake of sea-urchin sperm. The combined effect in *Strongylocentrotus droebachiensis*, however, is inferior to the effect of either calcium ions or the jelly solution, whereas in *Echinus esculentus* and in *Psammechinus miliaris* the combined effect is the strongest.

2. Heat-treatment and mild hydrolysis of the jelly solution improves this increasing action, the agent being contained in the clear solution and not in the precipitate which forms on hydrolysis.

3. The jelly coat of *Psammechinus miliaris* eggs can be dissolved by treatment with sea-water half-saturated with carbon dioxide. The significance of this finding on the structure and normal behaviour of the jelly coat is discussed.

My sincere thanks are due to the authorities of the Kristineberg Zoological Station of the Royal Swedish Academy of Science, Prof. NILS HOLMGREN and Dr. GUNNAR GUSTAFSON, for working facilities and generous supply of material.

Furthermore, I wish to acknowledge the valuable help of Miss HEDVIG TAMM and Mr. WALTER PUDECK during the practical work.

This work has been supported by grants from C. F. Liljevalch J:rs stipendiefond, the Rockefeller Foundation, and the doktorand-stipendium of the Swedish Government.

From the Kristineberg Zoological Station, Fiskebäckskil, and Wenner-Gren's Institute for Experimental Biology, University of Stockholm.

REFERENCES. 1. Lillie, F. R., Problems of fertilization. Chicago (1919). — 2. Vasseur, E., Arkiv Kemi 1, No. 14 (1949). — 3. Cornman, I., Biol. Bull. 80, 202 (1941). — 4. Vasseur, E., and Hagström, B., Arkiv Zool. 37 A, No. 17 (1946). — 5. Runnström, S., Bergens Museums Årbok 1927, No. 2. — 6. Vasseur, E., Acta Chem. Scand. 2, 900 (1948). — 7. Somogyi, M., J. Biol. Chem. 160, 61 (1945). — 8. Vasseur, E., unpublished experiments. — 9. Vasseur, E., and Immers, J., Arkiv Kemi 1, No. 6 (1949). — 10. —, Arkiv Kemi 1, No. 29 (1949). — 11. Wallenfels, K., Österr. Chem.-Ztg. 43, 187 (1940).

Tryckt den 18 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



An apparatus for continuous electrophoretic separation in flowing liquids

By HARRY SVENSSON and INGER BRATTSTEN

With 5 figures in the text

When LODGE (1) as the first measured directly the migration velocities of ions, he stabilized his solutions against convection with the aid of gels. The properties of the gel, however, influence the electric migration to a great extent. Thus the surface charges in the pores of the gel give rise to an electroosmotic flow of the whole liquid. In addition, mobilities and transference numbers are changed in a selective manner by the presence of capillaries. Measurements of these quantities are therefore best undertaken in free solution if the purpose is to characterize the migrating substance, and the moving boundary method was, in its further development, applied to gravitationally stable systems in fairly wide tubes. In this form, the analytical aspect is predominating, but a partial separation of the fastest and slowest components in a mixture is also possible. The requirement of gravitational stability makes a complete purification of the end components impossible, and the isolation of an intermediate component necessitates a repeated experiment.

In cases where the preparative purpose predominates, there is no reason to avoid gels or powders if these offer considerable advantages as stabilizing agents. Electrophoresis in a capillary system with the aim to separate isotopes was described by KENDALL and CRITTENDEN (2) and more recently by BREWER, MADORSKY *et al.* (3, 4). Several workers have also applied the method to biological problems; see *e. g.* COOLIDGE (5), CONSDEN, GORDON, and MARTIN (6), BUTLER and STEPHEN (7), WIELAND (8), and DURRUM (9). Common to the modifications of the method described in these papers are the following features. The mixture to be fractionated is introduced into a small section of the stabilizing agent. By passing a certain amount of electricity, complete separation of the components can be achieved in the column. The latter can then be cut into pieces and the components extracted. The use of capillary systems as the stabilizing principle is adopted in our apparatus also. In addition, the procedure is made continuous by a modification which permits the use of streaming liquids.

General principles

The mode of operation of the apparatus is schematically depicted in Fig. 1. The mixture to be separated and the buffer are flowing at a constant rate through a capillary system, and the electric current is applied perpendicularly

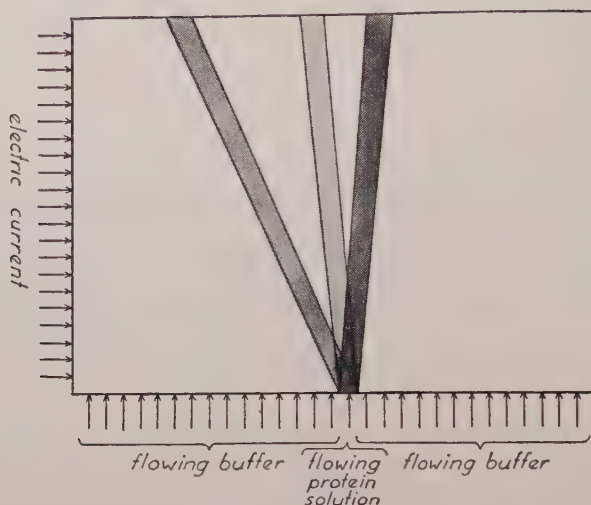


Fig. 1. The principle of electrophoretic fractionation in liquids flowing perpendicularly to the electric current.

to the direction of flow. A charged particle in solution will then migrate in a direction that makes a certain angle with the direction of flow; the tangens of this angle is equal to the ratio between the velocities due to electric migration and liquid flow. If the mixture to be fractionated is injected within a narrow region of the system, the different components will form separate bands in the column, with different angles of inclination. With a constant speed of flow and with a constant current, the angles of the different bands will keep constant during the separation. It is advantageous to use a capillary system with extended dimensions along both the flow and current directions. After passing the column, the liquid is distributed equally over a number of outlet tubes. A number of fractions will therefore collect, each containing substances with mobilities within a certain small range.

Apparently, the speed of flow and the current are the main factors which determine the sharpness of separation. If the difference in mobility between two components in the entering mixture is $\Delta u \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, the difference in volume velocity in the direction of the current between the two bands in the column will be

$$(1) \quad V_{\text{el}} = \frac{\Delta u \cdot i}{\kappa} \text{ cm}^3 \text{ sec}^{-1}$$

where i is the current and κ the conductivity. If complete separation is wanted, the volume velocity of flow in the perpendicular direction must not exceed this value, thus

$$(2) \quad V_{\text{flow max}} = V_{\text{el}}$$

Of the variables in the above expression, Δu and κ are related to constants of the apparatus only in so far as the presence of a capillary system influences

the mobilities, whereas the current is directly dependent upon the design of the apparatus. The maximum load that can be allowed depends upon the size of the cell and on the constructional and operational features for eliminating the heat generated by the current.

Among the factors that tend to cause mixing in the system the diffusion should be mentioned. A high linear rate of flow is needed to keep this factor negligible. The question is therefore indirectly related to the design of the apparatus. Also in other respects do constructive imperfections limit the sharpness of the separation. Thus the number of exit tubes cannot be arbitrarily increased.

The efficiency of the operation, *viz.* the yield of pure substances per unit time, is, in addition, connected with the protein and salt concentrations. On reducing the salt concentration, the conductivity decreases, and the difference in mobility, in general, increases, two favourable effects which more than balance the decrease in current necessary for retaining a constant load. On the other hand, too low salt and too high protein concentrations impair the constancy of the conductivity, which will result in migrating bands with sharp fronts and blurred rears. Moreover, if too high a protein concentration is used, viscosity effects may interfere and cause deviations from the simple relations of equations (1) and (2).

A number of the problems that present themselves in the construction of an apparatus according to these principles will be briefly discussed.

1. The nature of the stabilizing agent. For characterizing a capillary system, the following properties can be specified. a) The structure. Gels, powders, and fibrous materials, such as cotton, filter paper, and asbestos, have been used by earlier workers. b) The porosity. The stabilizing properties improve on reducing the porosity. On the other hand, a decreasing porosity increases the adsorption, the resistance to flow, and the electroosmotic flow. It will therefore be necessary to make a compromise. c) The adsorptive properties. It is of course desirable in this technique that the packing material shows no or only slight adsorptive power. It may be impossible to satisfy this requirement for all substances subjected to electrophoresis. It is therefore desirable to have a choice between a number of packing materials which are useful for different purposes. d) The electrokinetic potential. A low electrokinetic potential is desirable. Not much is known about this quantity of solid phases in different media. A detailed investigation of this property on a number of packing materials would be very valuable and would perhaps make it possible to find suitable combinations of solid and liquid phases for which the electrokinetic potential vanishes.

2. The dimensions of the apparatus. These should be chosen according to the desired separation efficiency. In general, it will be sufficient to separate the mixture into fractions which differ by $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ in mobility. With a conductivity of, say, $3 \cdot 10^{-3} \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and a desired liquid flow of 1 ml per hour, we have to apply a current of 83 mA. This current must be distributed over a sufficiently large area to avoid undue heating. In order to facilitate the heat exchange with the surroundings, the cross section perpendicular to the current should have the form of an elongated rectangle, in close analogy to the Tiselius electrophoresis cells.

The dimension in the direction of the current is determined by the space required for the separation of the original mixed band into its component bands. As a matter of principle, the resolving power is independent of whether slowly flowing broad bands or rapidly flowing narrow bands are used (*cf.* equation (1)). However, broad bands necessitate a greater distance between the electrodes than do narrow bands. In addition, a rapid flow through the column is advantageous with regard to the diffusion. We have found that 5 mm bands are suitable. They may broaden to round 10 mm during the separation due to diffusion, boundary anomalies, and other causes. If we require a complete resolution of ten components with linearly distributed mobilities, 10 cm should thus be necessary. However, the migration may take place asymmetrically in the column, and the components may have a non-linear distribution in mobility, so a considerable margin will be necessary.

3. The liquid flow. It is essential for the proper operation of the apparatus that the ratio between current and speed of flow is kept constant during an experiment. Otherwise the components will switch from one outlet tube to another, and the fractions will be mixed. The simplest way to achieve this is to keep both flows constant. The liquid flow should be constant not only with respect to time; it should also be equal in all parts of the capillary system.

Let us assume first that the capillary spaces are evenly distributed and that the viscosity is constant throughout the apparatus. The requirement of constant flow is then fulfilled if the difference in pressure across the column in the direction of flow is constant. This should be possible to achieve whether the electroosmotic flow is balanced or not. In the latter case, there is no pressure gradient in the direction of the current, and the absolute pressures at the inflow and outflow edges are both constant. This state is also realized if the electrokinetic potential is cancelled. The experimental arrangement can be made very simple in this case since all the inlet buffer channels can be allowed to communicate with each other. A constant hydrostatic pressure is easily arranged with the aid of Mariotte flasks.

In the former case, the absolute pressures vary along the direction of the current, and the requirement is then that the two pressure functions differ by a constant only. This state can be experimentally realized by permitting the electroosmotic flow itself to develop balancing counterpressures.

In practice, small irregularities in the packing can never be avoided, and obviously the viscosity varies from one band to another. At the walls and in corners the capillary spaces are greater and the flow more rapid than within the column. Due to these wall effects, the thickness of the column should not be too small. These effects in the column can not be eliminated.

Differences in viscosity and streaming resistance in the inlet and outlet channels are another source of disturbance. They can be eliminated, however, by the same kind of autocompensation as was mentioned for the electroosmotic flow. The principle is that an increased resistance in one of the entrance tubes can be arranged to develop an increased driving pressure. Similarly, an increased resistance in an exit channel can be made to decrease a hydrostatic counterpressure.

A regular flow can also be obtained mechanically by individual adjustment of each volume velocity at the entrance and exit sides.

If the condition of constant pressure difference across the column is not fulfilled, successful separations can nevertheless be carried out, but the conditions in the column can not easily be predicted, and the bands will form certain curves instead of straight lines.

4. The electric current. A constant current is easily obtained with the aid of a current stabilizer. To secure a constant current density, the electrodes must be of approximately the same form as the cross section which is passed by current. The kind of electrodes that can be used depends upon the construction of the apparatus. If the electrode chambers contain free solution, there are few restrictions. If they are inserted into the capillary system, it is more difficult to find a suitable type of electrode. As a matter of principle, non-gassing electrodes are preferable or necessary, depending on the nature of the capillary system. However, we have tried silver — silver chloride electrodes in glass powder columns and found them to be unsuitable. A layer of electrolyte-poor solution develops close to the anode surface, which layer gives rise to a successively increased resistance and, consequently, to a considerable local heating. On the other hand, good results have been obtained with platinum wires inserted directly in glass powder, in spite of the gassing.

Whatever type of electrode is used, it is important to keep the electrode reaction products within a restricted range outside the space where the separation takes place. The use of a higher buffer salt concentration in the region between the electrodes and the moving boundaries was recommended by TISELIUS (10). In the case of platinum electrodes, acid and alkali are generally formed. Hence pH gradients develop and migrate towards the separation region. If flowing acid of sufficient concentration is used at the cathode, and flowing alkali at the anode, no acid or alkali is generated. Instead of the above-mentioned pH gradients, we will thus obtain such gradients which migrate in the opposite directions. The distance between the electrodes and the moving boundaries, then, need not be excessively great. Such an arrangement was used by KENDALL and CRITTENDEN (2).

5. Temperature and cooling. TISELIUS (11) reduced the temperature gradient within the separation channel in the moving boundary apparatus by giving it an elongated cross section, and the heat convection due to the residual temperature gradient was minimized by working at the density maximum of water. The first of these principles is essential in this apparatus also, whereas the second is not. The capillary system will make convective streamings impossible anyhow. As far as the efficiency of the separation is concerned, there seems to be no reason to adhere to $+4^{\circ}\text{C}$ as the working temperature. However, other considerations speak in favour of a low temperature. By now, a great number of mobility data referring to 0°C have been collected by the extensive use of Tiselius' apparatus. It may therefore be advantageous to operate this apparatus at the same temperature. Another reason is the risk for formation of bubbles originating from dissolved gases in the capillary system. Finally, a low temperature is to be preferred with regard to the instability of proteins at room and higher temperatures.

6. Methods for localizing the components in the fractions. Since the fractions are collected in separate containers, they are open to any suitable method

of identification. Properties such as colour, biological activity, specific chemical reactions and the like can be utilized. If the mobility is known, the exit point of the substance can be computed. In the case of a balanced electroosmosis, the mobility scale at the exit side of the column is given by equation (1). V and i are directly measurable quantities. The conductivity κ in the capillary system is not identical with that measured in free solution due to the surface conductance. Hence the conductivity should be measured in the capillary system. In the presence of an electroosmotic flow, the mobility scale will be linearly displaced, but not altered otherwise. If, therefore, an easily recognizable reference substance with known mobility is included in the mixture, the linear shift may easily be compensated for. As the reference substance some coloured protein, *e.g.* hemoglobin, should be suitable. Instead of measuring the conductivity in the capillary system, use can be made of two reference substances with widely different mobilities. One of them will then give the additive correction for electroosmotic flow, whereas the distance between them gives the mobility scale.

It should be pointed out that mobilities measured in the column are not necessarily the same as those measured in free solution. The method outlined above may therefore give only approximate results.

The experimental arrangement

1. **Description of the apparatus.** Fig. 2 shows a drawing of the complete experimental arrangement used hitherto. The separation takes place in the box seen in the centre of the figure. It is made of perspex (lucite) and filled with glass powder. The dimensions are 20 cm $\times$ 32 cm $\times$ 2 cm. The electrode chambers, situated to the left and to the right in the box, are separated from the middle part by two perforated walls. If filter papers are pressed against the outer sides of these walls, the gases developing at the electrodes are unable to penetrate into the separation region. Between the perforated walls, along the upper edge of the box, twentythree vertical separation walls, 6 cm high, are inserted. They form twentyfour small chambers open in top and bottom. Along the bottom of the box, there are twentyeight equidistantly placed outlet tubes ending with short capillaries. To each of them a vacuum rubber tube of small bore is attached. The rubber tubes end with small glass tube hooks which can be placed at varying levels to regulate the speed of flow. The fractions flowing out through these tubes are collected in test tubes.

The electrodes are platinum wires which are inserted in the glass powder and extend from top to bottom in the electrode chambers.

Above the glass powder there is some space for free liquids, the levels of which are kept constant with the aid of Mariotte flasks. One of the central compartments is connected to the protein container. The anode compartment is supplied with an alkali solution from one Mariotte flask, the cathode compartment with acid from a similar flask. The remaining compartments are all communicating with each other by small siphons and are connected to the buffer in a fourth Mariotte flask.

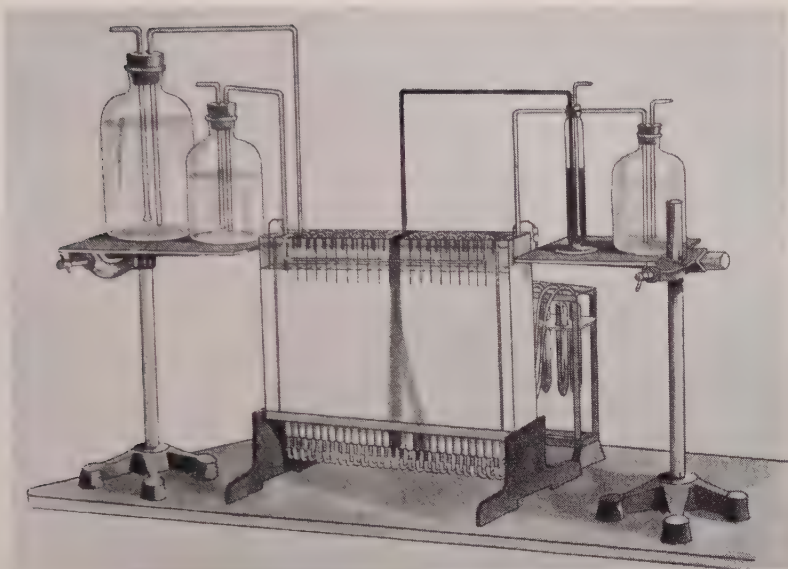


Fig. 2. The experimental arrangement.

2. **The packing of the powder.** An even packing of the glass powder is essential for good results. We have tried different procedures and found the following one superior. The glass powder was obtained by sedimentation fractionation of commercial powder into four different grades, one with almost instantaneous sedimentation, one with a sedimentation velocity of about 10 cm per minute, one with about 2 cm per minute, and one with extremely slow sedimentation. The heaviest fraction, with a grain size of the order of 0.1 mm, was used as packing material in the box, and fraction No. 2 or 3 for filling the outlet tubes in the bottom. Before filling, the glass powder was freed from impurities by boiling with strong nitric acid. The use of a powder homogeneous in grain size was found to be very advantageous in comparison with the unfractionated powder which contained a large portion of very finely disintegrated material. The coarse powder was sufficiently fine-grained to prevent convection in the liquid and gave a moderate flow resistance.

The powder was packed in the wet condition. The whole apparatus was filled with water, and a suspension of the powder was transferred to it with the aid of a siphon. The best results were obtained if the suspension was kept under stirring vigorous enough to prevent sedimentation. A slight vibration of the apparatus during the transfer of the powder gave a good close-packing.

Results

A number of test runs have been made using solutions containing one or more coloured substances. In order to test the linearity of flow, four chambers were fed with an indicator solution, the others with buffer. The Mariotte flasks

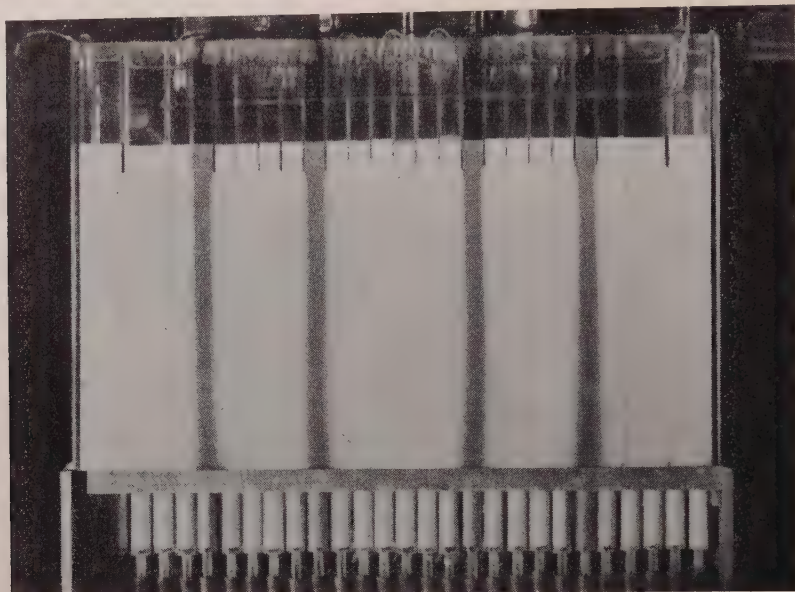


Fig. 3. Flow test without current.

were adjusted to give exactly the same level in all chambers. After the coloured solutions had reached the bottom of the box, one could view directly the course of the flow, see Fig. 3. From this figure, it is evident that it is possible to obtain practically linear and vertical flow. It is also remarkable that the width of the bands remain essentially constant throughout the column. This depends of course partly on the relatively high flow velocity used in this experiment (about 10 ml per hour). It also indicates, however, that the powder was very evenly packed. In cases where sedimentation lines were visible in the packing, it was observed that the band of the flowing dye broadened preferentially along these lines. This effect was still more pronounced on passage of current.

The course of the coloured bands were very sensitive to small changes in the liquid levels in the top containers. A difference in level between the dye and buffer containers did not change the direction of flow, but influenced the widths of the bands. Thus a very narrow band could be obtained by lowering the level of the dye solution a few millimeters below the buffer level, and, correspondingly, a very broad band could be obtained by raising the dye level above those of the buffer. This phenomenon is sometimes advantageous since it is possible in this simple way to vary the flow velocity of the mixture under separation.

If the level in one of the neighbouring chambers was raised or lowered this resulted in a change in the direction of flow.

Fig. 4 shows a separation experiment with a mixture of two acidimetric indicators, bromphenol blue and bromthymol blue in acetate buffers of ionic strength 0.025. Their pK values are 3.8 and 6.8 respectively. At the pH of

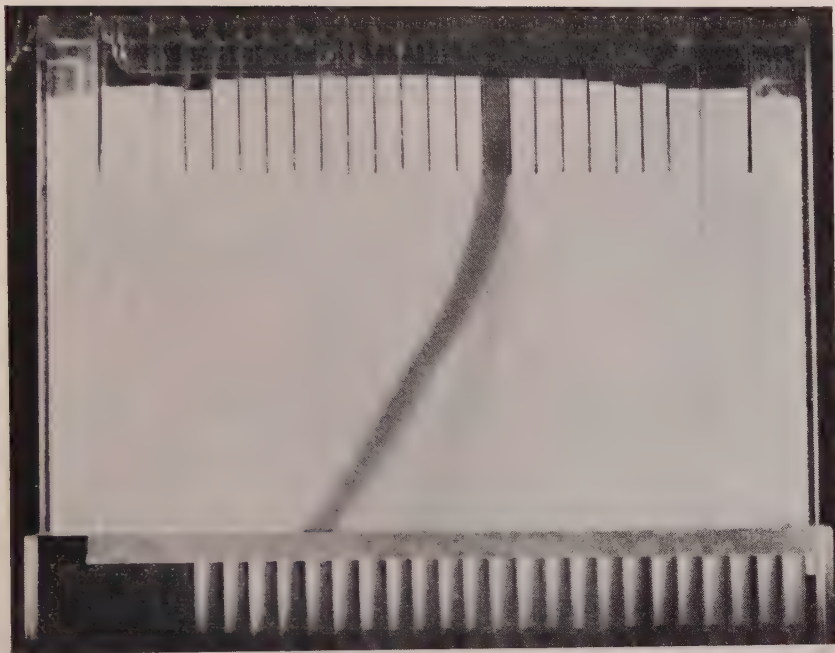


Fig. 4. Fractionation experiment with a mixture of bromphenol blue (to the left) and bromthymol blue (to the right). pH 5.3. Ionic strength 0.025. Current 60 mA. Speed of flow 2.5 ml per hour.

the buffer, 5.3, the former indicator is almost completely ionized, the latter almost uncharged, and they have a considerable difference in electric mobility. Complete separation was possible even with a comparatively high speed of flow. Bromphenol blue migrated as a violet band in front of the yellow band of bromthymol blue, and the pure substances were collected in different exit tubes. Due to a slight broadening of the bands, each substance appeared in two or three tubes. After stopping the addition of dye solution, the inlet compartment was connected with the neighbouring buffer compartment by a siphon. It was then observed that the indicators descended through the column leaving uncoloured liquid and glass powder behind. This shows that the substances were not irreversibly adsorbed under these conditions. The conclusion was confirmed by quantitative spectrophotometric analysis of the original solution and of the fractions from the outlet tubes. The concentration distribution in the fractions of the two components is shown schematically in Fig. 5. In all, 29.5 ml dye solution was passed through the apparatus during 8 hours. This quantity of solution contained 9.84 mg bromphenol blue and 17.6 mg bromthymol blue. In the samples were recovered 9.58 mg of the former and 17.6 mg of the latter in 96.0 and 80.8 ml of solution, respectively. The current was 60 mA, and the temperature in the middle of the packing 32° C.

A number of experiments have also been performed with coloured proteins. Synthetic mixtures of phycoerythrin and phycocyanin, as well as unfractionated extracts of the algae in which they occur have been used. These experiments

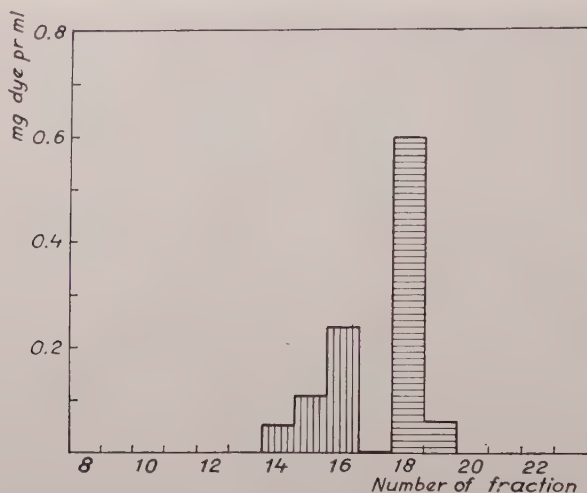


Fig. 5. Concentration distribution of bromphenol blue and bromthymol blue in the fractions obtained in the experiment pictured in Fig. 4.

were performed in phosphate buffers of pH 7.7 and ionic strength 0.025 and 0.050. The separation of phycoerythrin and phycocyanin was easily performed. In the unfractionated extract, a third, green component was observed which moved faster than the phycoerythrin but did not resolve completely from it. In these experiments, the fractionation could be run at speed of 2.5 ml per hour.

The electroosmotic flow was much more pronounced in these experiments than in those with acetate buffers. As a result of this, all components, although negatively charged, moved towards the cathode. The bands showed a slight curvature because the electroosmotic flow was not balanced. No evidence of irreversible adsorption was found in these experiments, either.

Discussion

The experiments carried out so far show that the principle of crosswise current and liquid flow is working satisfactorily. The apparatus must be improved considerably, however. The electroosmotic effect has not yet been balanced. Current stabilization and thermostating are lacking. In particular, an increased number of exit channels are needed. An improved arrangement for collection of samples is desirable. It can be expected, however, that further work according to the principles outlined in this paper will make the apparatus a very useful instrument.

The continuous operation makes the apparatus well adapted to widely different quantities of the mixture to be fractionated. Under standard conditions, it is capable of fractionating 15 to 20 ml a day with a sharpness of separation of $1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. For quantities smaller than 5 ml a smaller apparatus is desirable. Our first experiments with this technique were carried out in filter papers hanging over the edge of a buffer container and with a small flap dipping into a protein or dye container. This technique was abandoned

in favour of that described here because of difficulties with evaporation and because a greater capacity was desired. DURRUM (6), however, has successfully run filter paper electrophoresis in strips clamped between glass plates, and we believe that a suitable micro-preparative apparatus according to the principles outlined here could easily be built in that way. The sample collector arrangement in our filter paper experiments was simply made by cutting the lower end of the paper zigzag.

On the other hand, it will also be possible to increase the capacity considerably for large scale fractionations. An apparatus for 1 amper would have to be 1.5 to 2 meters high if the thickness of the column is not increased.

SUMMARY

An apparatus for complete and continuous electrophoretic separation in capillary systems is described. The principle involved is to use a constant liquid flow across the column in a direction perpendicular to the current. The technical problems connected with the construction of such an apparatus are discussed. Some applications of the method to coloured model substances are reported.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to express their sincere thanks to Professor THE SVEDBERG and Professor ARNE TISELIUS for the encouraging interest they have taken in this work. We are indebted for discussions and criticism as well as for supply of material.

The work has been financially supported by The Swedish Natural Science Research Council, The Wallenberg Foundation, and LKB-Produkter Fabriks-AB, Stockholm.

The Institute of Biochemistry, University, Uppsala, Sweden.

REFERENCES. (1) Lodge, O., Brit. Ass. Rep. 1886, 389. — (2) Kendall, J. and Crittenden, E. D., Proc. Nat. Acad. Sciences 9 (1923) 75. — (3) Brewer, A. K., Madorsky, S. L., Taylor, J. K., Dibeler, V. H., Brandt, P., Parham, O. L., Britten, R. J., and Reid, J. G., J. Res. Nat. Bur. Stand. 38 (1947), 137. — (4) Madorsky, S. L., and Straus, S., J. Res. Nat. Bur. Stand. 38 (1947), 185. — (5) Coolidge, T. B., J. Biol. Chem. 127 (1939), 551. — (6) Consden, R., Gordon, A. H., and Martin, A. J. P., Biochem. J. 40 (1946), 33. — (7) Butler, J. A. V., and Stephen, J. M. L., Nature 160 (1947), 469. — (8) Wieland, T., Naturw. 35 (1948), 29. — (9) Durrum, E. L., Personal communication. — (10) Tiselius, A., Svensk Kem. Tidskr. 50 (1938), 58. — (11) —, Trans. Farad. Soc. 33 (1937), 524.

Tryckt den 16 november 1949.

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Branched long chain compounds.

The synthesis of 20,20-dimethylheneicosanoic and 14,14-dimethylpentadecanoic acids.

By KARL ERIK AROSENIUS, STINA STÄLLBERG-STENHAGEN and
EINAR STENHAGEN

It was shown previously by one of us (1) that long chain compounds containing tertiary carbon atoms, *viz.* having methyl side chains, can be conveniently prepared by lengthening the chain of disubstituted acetic acids $RR'CHCOOH$ via β -keto esters of the type $RR'CHCOCH_2COOCH_3$. The possibility of extending this method to the synthesis of long chain compounds containing a quaternary carbon atom, starting from trialkylsubstituted acetic acids $RR'R''CCOOH$ and proceeding via β -keto esters of the type $RR'R''CCOCH_2COOCH_3$, has now been studied. It was found that *methyl 3-keto-4,4-dimethylpentanoate* (III) could be obtained in 35 % yield from trimethylacetic acid (I) by the modified BOUVEAULT-BONGERT-HUNSDIECKER procedure (1,2). The yield is lower than that obtained when normal chain (2) or α -methyl substituted acids (1) are used as initial material for the β -keto ester synthesis, but this may, at least partly, be due to the fact that (III) is somewhat difficult to separate from methyl acetoacetate.

Ethyl 3-keto-4,4-dimethylpentanoate (ethyl pivalylacetoacetate) has been prepared by WAHLBERG (3,4) from pinacolone via the following steps: monobromo derivative $\rightarrow$ cyanopinacolone $\rightarrow$ imino ether hydrochloride $(CH_3)_3CCOCH_2C(OC_2H_5)=NH \cdot HCl$. On being heated to $50-60^\circ$ in water solution the last-mentioned compound is converted into the β -keto ester. It is evident that the methyl ester (III) could also be prepared by WAHLBERG's method, but this route appears less convenient than the one employed. Trimethylacetic acid (I) is available commercially.

Alkylation of (III) with methyl 17-iodoheptadecanoate (IV) under the usual conditions (cf [1]) gave, after hydrolysis and ketonic cleavage of the alkylation product (V), *19-keto-20,20-dimethylheneicosanoic acid* (VI) in 75 % yield. Alkylation of (III) with ethyl 11-iodoundecanoate gave in an analogous manner *13-keto-14,14-dimethylpentadecanoic acid*. Owing to the high solubility of this keto-acid in all common organic solvents the isolation by means of crystallization was difficult, and the yield correspondingly lower (42.5 % of the theoretical).

Reduction of the keto-acids was carried out by HUANG-MINLON's (5) modification of the WOLFF-KISHNER method, employing the conditions which CASON (6) found necessary for the reduction of sterically hindered acids of the type (VI). This mode of reduction appears to be the only satisfactory one at present available for the reduction of keto-acids of this type.

20,20-Dimethylheneicosanoic (ω -neopentylstearic) acid (VII) and 14,14-dimethylpentadecanoic (ω -neopentyllauric) acid were thus obtained from the corresponding keto-acids. The yield of crude reduced acids was satisfactory (71 % in the case of [VII]), but owing to the properties of the acids, including high solubility and polymorphism, purification by means of crystallization from solvents proved difficult, and the acids were therefore purified via the well-crystallizing amides.

The ω -trimethyl substituted acids show a much lower melting point than the normal chain or the ω -dimethyl substituted isomers (*isoacids*). The highest melting modification of 20,20-dimethylheneicosanoic acid (C_{23}) melts at $63.3-63.8^\circ$, and the C_{17} acid melts at $42.9-43.3^\circ$. *n*-Tricosanoic acid melts at $79.2-79.6^\circ$ (7) and *n*-heptadecanoic (margaric) acid at 60.7° (7). The C_{17} *isoacid* melts at $59.3-59.8^\circ$ (8). The C_{23} *isoacid* has not been reported, but the data available for other members of this homologous series (8) indicate a m.p. of about 78° for this acid. It appears, therefore, that the size of the ω -neopentyl group is large enough to interfere with the packing of the long chains.

14,14-Dimethylpentadecanamide melts at $104.0-104.5^\circ$, i.e. much higher than the C_{23} *homologue* which has m.p. $98.3-98.6^\circ$, and also higher than the C_{17} *isoacid* amide (m.p. $98.2-98.7^\circ$ [8]). It thus appears that, in the ω -neopentyl substituted long chain acid amide series, irregularities in melting points occur similar to those found for the *isoacid* amides.

The behaviour of the ω -neopentyl substituted keto-acids is abnormal in so far that their m.p.'s are lower than those of the corresponding reduced acids, a phenomenon which occurs very rarely in the case of long chain acids.

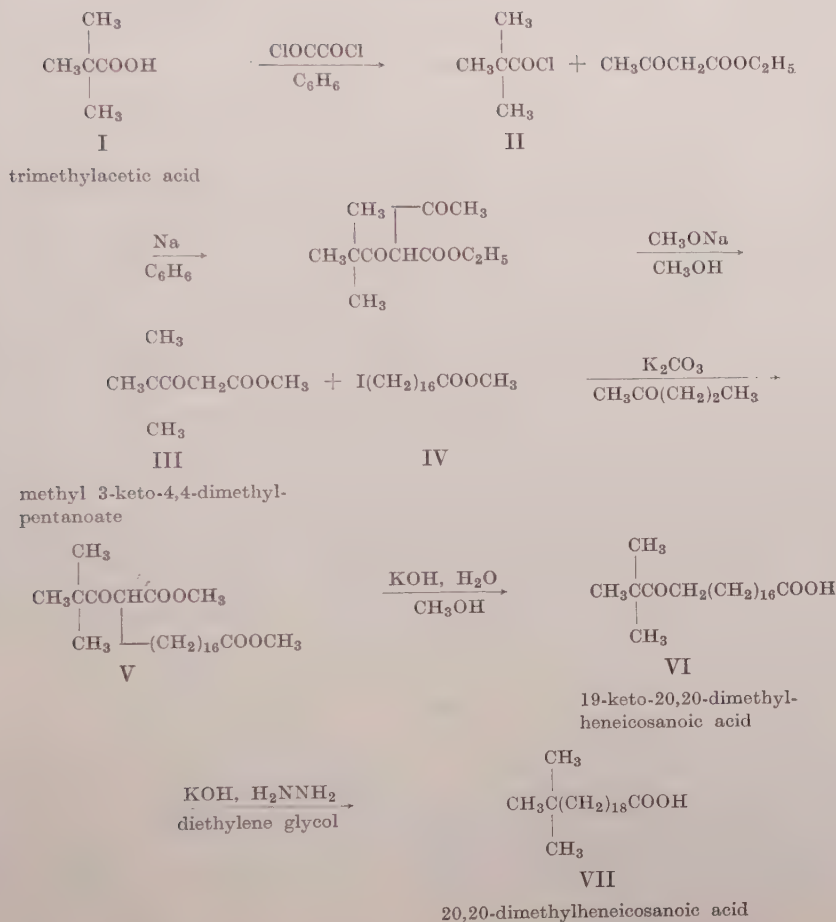
It seems likely that the method described could at any rate be extended to the synthesis of long chain compounds having a *gem*-dimethyl group in other positions than (ω -1) by using dimethylalkylacetic (alkyl = ethyl or longer) acids as initial material. It was found previously (9) that it was not possible to prepare optically active compounds containing a tertiary carbon atom, because the alkylation of an active β -keto ester $RR'CHCOCH_2COOCH_3$ gave a completely inactive keto-compound $RR'CHCOCHR''$. A similar racemization would probably not occur in the alkylation of active β -keto esters of the type $RR'R''CCOCH_2COOCH_3$, but the reduction of the resulting active keto-compounds $RR'R''CCOCHR'''$ would probably involve difficulties owing to the α -position of the keto-group to the active centre, and the high temperature necessary in the final step of the reduction. Active long chain compounds of the type $RR'R''R'''C$ are probably best prepared by lengthening the chain of resolved half-esters of β , β -dialkylglutaric acids as, apart from the difficulties mentioned above, trialkylacetic acids with two or three alkyl groups longer than methyl are comparatively inaccessible (cf [10]).

Experimental.¹

Methyl 3-keto-4,4-dimethylpentanoate (III). Trimethylacetic acid (33.5 g, prepared according to Org. Synth. [11]) was converted into the acid chloride (II) by means of oxalyl chloride (55 g) in *n*-hexane (50 ml; the commercial product was rendered olefin-free by treatment with oleum, followed by a careful washing with sodium hydroxide solution and distillation). Benzene (cf [1,2]) is less suitable as solvent

¹ The melting points and X-ray spacings were determined in the manner previously described (cf [1]).

Chart.



in the present case because its high b.p. renders its removal from the acid chloride difficult. The mixture was kept at a temperature of 40° for three hours. Distillation through a 50 cm vacuum-jacketed column of the WESTON type gave 34.35 g (85 % of the theoretical) of trimethylacetyl chloride, b.p. 104° , 754 mm.

Granulated sodium (8 g, 6 % excess over the acid chloride) was added to ethyl acetoacetate (50 g, 20 % excess) in benzene (650 ml) solution. The mixture was stirred and heated under reflux until the formation of the sodium derivative was complete. The acid chloride (34.35 g) was added, and the mixture refluxed for 10 minutes. After cooling and acidification in the usual manner (cf [2]) the acylation product was taken up in ether. The ether solution was washed with water and dried by means of sodium sulphate. The solvent was evaporated and the crude acylation product decomposed by adding a solution of sodium (8 g) in methanol (225 ml) and keeping the mixture at room temperature for 4 hours. After acidification the mixture was extracted by means of ether in

the usual manner. Distillation through a one metre PODBIELNIAK column gave, after a fore-run consisting of methyl trimethylacetate and methyl acetoacetate, 18.38 g (35 % of the theoretical, calculated on the trimethylacetic acid used) of *methyl 3-keto-4,4-dimethylpentanoate*, b.p. 67–70°, 13 mm.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_8H_{14}O_3$	(158.2)	C, 60.74; H, 8.92 %
Found		C, 60.91; H, 8.94 %

19-Keto-20,20-dimethylheneicosanoic acid (VI). Methyl 3-keto-4,4-dimethylpentanoate (3.86 g), methyl 17-iodoheptadecanoate (10.0 g, m.p. 52.5–52.9°, prepared by the method of HUNSDIECKER and HUNSDIECKER [12]), dry potassium carbonate (15 g), and dry methyl-*n*-propyl ketone (40 ml) were refluxed (calcium chloride tube) for 18 hours. The reaction mixture was acidified by means of dilute hydrochloric acid, and the alkylation product taken up in ether. The ether solution was washed with water, dried, and the solvent distilled off. Hydrolysis and ketonic cleavage of the alkylation product was effected by adding a solution of potassium hydroxide (22 g) in water (22 ml) and methanol (330 ml), and keeping the mixture at a temperature of 50° overnight. The reaction mixture was acidified, extracted with ether in the standard manner, and the crude keto-acid crystallized from light petroleum (b.p. 40–60°). 7.32 g (75 % of the theoretical) of *19-keto-20,20-dimethylheneicosanoic acid* was obtained in the form of beautiful fine needles, m.p. 59.5–59.7°. The m.p. was unchanged on further recrystallization from the same solvent. A previously melted specimen remelted at 59.3–59.6°.

Long X-ray spacing (pressed specimen) 40.0 Å, calculated from a very good photograph.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{44}O_3$	(368.6)	C, 74.94; H, 12.03 %
Found		C, 74.58; H, 12.01 %

13-Keto-14,14-dimethylpentadecanoic acid was prepared in a manner exactly analogous to that described above, starting from methyl 3-keto-4,4-dimethylpentanoate (16 g), ethyl 11-iodoundecanoate (34.4 g, cf [13]), potassium carbonate (40 g), and methyl-*n*-propyl ketone (150 ml). The mixture was refluxed for 20 hours, worked up, and hydrolysis and ketonic cleavage of the alkylation product effected by means of potassium hydroxide (68 g) in water (68 ml) and methanol (1020 ml). The crude keto-acid was crystallized from light petroleum (b.p. below 40°) in the cold, giving 9.7 g of slightly yellow-coloured crystals. From the mother liquors there was obtained, after low-temperature crystallization from acetone, 2.5 g of a product of similar properties. The two samples had the same m.p., viz. 34–36°. Yield 12.2 g or 42.5 % of the theoretical. After treatment with charcoal and recrystallization from light petroleum (b.p. below 40°) the white microcrystalline *13-keto-14,14-dimethylpentadecanoic acid* melted at 37.5–38.0°. A previously melted sample did not on remelting give a clear melt until a temperature of 40.5–41° was reached, indicating dimorphism. Both pressed and previously melted specimens gave similar diffraction patterns, in which the lines corresponding to the 00l reflexions were somewhat blurred. Long spacing 31 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{17}H_{32}O_3$	(284.5)	C, 71.79; H, 11.34 %
Found		C, 71.53; H, 11.22 %

20,20-Dimethylheneicosanoic acid (VII). 3.0 G of the keto-acid (VI), 3 g of potassium hydroxide, 3 ml of 85 % hydrazine hydrate, and 25 ml of diethylene glycol were refluxed on a metal bath for two hours. The condenser was removed, and the temperature allowed to rise until the temperature inside the flask was about 215°, when the condenser was again put in place. The mixture was kept at this temperature for a period of three hours; after this time the colour of the reaction mixture was light yellow. After cooling to about 100° an excess of hydrochloric acid was added. The organic material was taken up in ether. After the extracts had been washed with water and dried, the ether was distilled off and the residue crystallized from acetone, giving 2.06 g (71 % of the theoretical) in the form of yellow-white spherulitic aggregates. M.p. 59°. After treatment with charcoal in ethanol solution, and crystallization from ethanol, the acid was colourless but still in the form of small spherulites, m.p. 61.4–62.0°, after previous melting 62.7–63.1°. The acid is thus dimorphic. The acid separated in the form of spherulites from all solvents tried, the reason probably being that the two crystalline forms crystallize out simultaneously. The final purification of the acid was carried out via the amide described below. The amide (0.9 g) was hydrolyzed by refluxing for 48 hours with potassium hydroxide (3 g), water (2 ml) and ethanol (30 ml). After crystallization from ethanol *20,20-dimethylheneicosanoic acid* was obtained in the form of small white round balls, m.p. 61.2–62.2°. The melting point of previously melted material was now 63.3–63.8°. Both pressed and melted specimens gave a long X-ray spacing of 40.0 Å, but in both cases the 00l reflexions were somewhat blurred.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{46}O_2$	(354.6)	C, 77.90; H, 13.08 %
Found		C, 77.99; H, 13.12 %

20,20-Dimethylheneicosanamide. 1.60 G of crude acid was converted into the amide via the acid chloride in the usual manner (cf e.g. [1]). After crystallization from 99.5 % ethanol in the cold and from light petroleum (b.p. 95–100°) the amide (1.14 g or 71 % of the theoretical) was obtained in the form of small colourless plates, m.p. 98.3–98.6°. After previous melting the m.p. was 98.0–98.3°. Long X-ray spacing (pressed specimen) 38.8 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{23}H_{45}ON$	(353.6)	N, 3.96 %
Found		N, 3.99 %

14,14-Dimethylpentadecanoic acid. The reduction of the keto-acid (4.0 g) was carried out in a manner analogous to that described in the case of the higher homologue. The final heating was carried out for a period of 6.5 hours, using a metal bath kept at 225–230°. The period of heating was evidently unnecessarily long, and the reaction mixture darkened considerably. The reaction mixture was acidified and worked up in the usual manner. Distillation gave 1.75 g (44 % of the theoretical) of *14,14-dimethylpentadecanoic acid*, m.p. 41.8–42.4°. The acid had a microcrystalline appearance. Owing to the high solubility of the acid in all common organic solvents, the purification by crystallization proved difficult. A pure specimen of the acid was therefore prepared by hydrolysis of the amide described below. 1.0 G of the amide was refluxed for 48 hours with potassium hydroxide (5 g), water (3 ml) and ethanol (60 ml). After distillation, the acid

(b.p. 163° , 1 mm) melted at $42.9\text{--}43.3^{\circ}$. The specimen (0.8 g) had a pure white, microcrystalline appearance. The X-ray diffraction pattern of the melted material indicated a mixture of at least two crystalline forms.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{17}H_{34}O_2$	(270.5)	C, 75.50; H, 12.67 %
Found		C, 75.69; H, 12.65 %

14,14-Dimethylpentadecanamide was prepared via the acid chloride from 1.70 g of distilled acid (m.p. $41.8\text{--}42.4^{\circ}$). Crystallization from 85 % methanol gave the *amide* (1.25 g or 74 % of the theoretical) in the form of large, but very thin, lustrous plates. There was a certain tendency for crystal growth to occur in skeleton forms. The amide melted at $104.0\text{--}104.5^{\circ}$, unchanged on further recrystallization or after melting. A pressed specimen gave a beautiful diffraction pattern with a long crystal spacing of 24.7 Å.

<i>Anal.</i> : Calcd for $C_{17}H_{35}ON$	(269.5)	N, 5.20 %
Found		N, 5.22 %

We are indebted to Mr. I. ALPEROWICZ and Mr. W. KIRSTEN of the micro-analytical laboratory of this Institute for the analyses reported in this paper, and to the Swedish National Anti-tuberculosis Association and the Rockefeller Foundation for financial support.

SUMMARY

Trimethylacetic acid has been converted into methyl 3-keto-4,4-dimethylpentanoate in 35 % yield by the modified BOUVEAULT-BONGERT-HUNSDIECKER procedure. Monoalkylation of this β -keto ester with ω -iodo-esters, followed by hydrolysis and ketonic cleavage of the alkylation product, gives good yields (up to 75 % of the theoretical) of long chain keto-acids with the keto-group in α -position to the quaternary carbon atom carrying two methyl side chains. Reduction of the keto-acids is carried out by HUANG-MINLON's modification of the WOLFF-KISHNER method.

The synthetic procedure outlined above has been applied to the synthesis of 20,20-dimethylheneicosanoic (ω -neopentylstearic) acid and 14,14-dimethylpentadecanoic (ω -neopentyllauric) acid.

Institute of Medical Chemistry, University of Uppsala.

- REFERENCES. 1. Stållberg-Stenhagen, S., Arkiv för Kemi, Min. o. Geol. 22 A, No. 19 (1946). — 2. *Idem, ibid.* 20 A, No. 19 (1945). — 3. Wahlberg, E., Arkiv för Kemi, Min. o. Geol. 4, No. 15 (1911). — 4. *Idem*, »Om pivalylättikester», Thesis, Uppsala (1914). 5. Huang-Minlon, J. Amer. Chem. Soc. 68, 2487 (1946). — 6. Cason, J., J. Org. Chem. 13, 227 (1948). — 7. Francis, F., and Piper, S. H., J. Amer. Chem. Soc. 61, 577 (1939). — 8. Arosenius, K. E., Stållberg, G., Stenhagen, E., and Tägtström-Eketorp, B., Arkiv för Kemi, Min. o. Geol. 26 A, No. 19 (1948). — 9. Stållberg-Stenhagen, S., *ibid.* 26 A, No. 12 (1948). — 10. Birch, A. J., and Robinson, Sir R., J. Chem. Soc. 1943, 442. — 11. Org. Syntheses, Coll. Vol. I, 526. — 12. Hunsdiecker, H., and Hunsdiecker, Cl., Berichte 75, 291 (1942). — 13. Stållberg-Stenhagen, S., Arkiv för Kemi, Min. o. Geol. 19 A, No. 28 (1945).

Tryckt den 18 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Agglutination of sea urchin eggs by nucleoproteins

By TORE HULTIN

According to the fertilisation theory of F. R. LILLIE (8), the "spermiofilic" side chains of egg "fertilizin" are species-specifically neutralized either by the "sperm-receptors" of homologous sperm or by "anti-fertilizin" from the interior of the egg. Many attempts have been made to extract these latter factors from eggs and sperm (2, 3, 13, 14). TYLER & O'MELVENY (17) applied the term "antifertilizin" to sperm extracts also, evidently in the same sense as the term "sperm-receptor" introduced by LILLIE (8). They summarized the properties of such extracts from sea urchin sperm (17). The "antifertilizin" extracted from sea urchin sperm was characterized as an egg-agglutinin and egg-jelly precipitin.

In previous papers (4, 5) the present author showed that basic proteins which can be isolated from the nucleoprotein complex of invertebrate sperm nuclei can be characterized in the same way. It was demonstrated¹ (5) that because of the high ionic strength of sea water, the nucleoprotein complex² of the sperm nuclei may swell³ as a result of rather slight injury, releasing traces of nucleoproteins into the surrounding sea water. The nucleoprotein traces contain bound, basic proteins. It would be unfortunate if properties belonging to released nucleoproteins were ascribed to the species-specific factor, anti-fertilizin (= sperm-receptor), which a priori must be presumed to exist in the surface of the sperm (8).

Because of the very great capacity of fertilizin for unspecific reaction with basic proteins, it was considered necessary (5) that at least the following conditions be fulfilled before a sperm-extract was described as anti-fertilizin.

1. No traces of nuclear material⁴ were allowed to be present.
2. The extract had to exhibit about the same species specificity in its reactions with fertilizin as the spermatozoa themselves.

These conditions were found not to be fulfilled in "antifertilizin" preparations obtained in the classical manners (by heating [2] or pH 3.5 treatment [17]) from the sperm of some European sea urchins investigated.

These views have been partially criticized by METZ (9). The fact (5) that whole series of sperm extracts from *Arbacia lixula* (L.) and *Sphaerechinus gra-*

¹ For all details see HULTIN (5).

² In the sense of POLLISTER & MIRSKY (11).

³ Cf.: TYLER (15).

⁴ The chemical tests for basic proteins are very insensitive. Tests for nucleic acid must be used, which are equally valid for demonstration of nucleoprotein (cf. METZ [9]).

nularis (LM.) had exactly the same capacity to neutralize *Arbacia* fertilizin is, according to METZ, no proof that the "antifertilizin" extracts lack species specificity since cross reactions between echinoid sperm and fertilizin are known. However, the species used in these specificity experiments are distant, and it has long been well known (1) that cross agglutinations between them in both directions are very weak or absent. It must be considered quite evident that the "antifertilizin" preparations did not fulfill the second condition mentioned above.

In order to distinguish the properties of "antifertilizin" from those of basic proteins, METZ introduced instead of the species specificity criterion the following two characteristics:

1. "Antifertilizin" acts only on eggs, but basic proteins act on both eggs and sperm.

2. The activity of "antifertilizin" is reduced when subjected to the procedure used to extract basic proteins.

It will be shown below that these distinctions are valid only if comparison is made with *free* basic proteins. In the previous paper (5), however, it was demonstrated that traces of nucleoprotein are released into the sea water during the classical "antifertilizin" extractions. The nucleoprotein complex contains basic proteins bound to desoxyribonucleic acid (5). Using METZ's criteria no difference could be found between the effects of "antifertilizin" and nucleoprotein (bound basic protein).

Nucleoprotein acts only on eggs but free basic proteins act on both eggs and sperm

"Antifertilizin" was prepared from sperm of *Psammechinus miliaris*¹ (GMELIN) and *Echinocardium cordatum* (PENN.), 1) by freeze-thawing (14), 2) by heating (2), and 3) by pH 3.5 extraction (17). Nucleoprotein (11) was prepared from sperm of the same species and after final reprecipitation was suspended in sea water.

These 4 preparations behaved in a quite identical manner when tested on eggs and sperm of both species.² In all combinations the eggs agglutinated and the jelly was precipitated. No species specificity was found. Spermatozoa were not agglutinated.

Purified basic proteins (5, 7), on the other hand, reacted with both eggs and sperm.

Similar experiments were performed using *Paracentrotus lividus* (LM.) and *Arbacia lixula* (L.).

Most likely, the jelly of sea-urchin eggs is just acid (18) enough to free some bound basic protein groups from nucleic acid, according to the equilibrium law. The spermatozoa are acid (10) but to a lesser degree. They are able to react only with free basic protein groups.³

¹ Experiments with *Psammechinus* and *Echinocardium* were performed at the zoological station of Kristineberg on the Swedish west coast. *Arbacia* and *Paracentrotus* were used at the zoological station of Naples.

² No cross agglutinations have been found between these very distant species (cf. 12).

³ As a rule, protamines cannot agglutinate sea urchin sperm (4). This fact is most likely due to the lesser dimensions of protamine molecules as compared with the basic proteins from sea urchin sperm (7). If traces of desoxyribonucleic acid are added to the protamine solutions, a weak tail-agglutination can often be obtained. Most likely, the protamine molecules are linked together by the few nucleic acid molecules present. The colloidal units become elongated, and the capacity of the excess free basic protamine groups to fix distant surfaces is increased.

The activity of nucleoprotein is reduced when the latter is subjected to the procedure used to extract free basic proteins

"Antifertilizin" and nucleoprotein solutions were prepared from sperm of *Arbacia lixula* according to the description above and adjusted to pH 0.8. The precipitates which formed at pH 2–3 were centrifuged off 4 hours later as described by METZ (9), and the supernatants were neutralised. The jelly precipitating properties were more or less reduced. The "antifertilizin" and nucleoprotein preparations behave quite identically. The precipitates which formed at pH 2–3 contained desoxyribonucleic acid (FEULGEN-reaction. Cf.: 5).

The simplest explanation of the decrease in activity when all these extracts containing nucleoprotein are acidified is that the precipitated nucleic acid is freed only incompletely from bound basic proteins, which therefore disappear from the solution and are removed during centrifugation. The great capacity of free basic proteins also, for adsorption to precipitates has been demonstrated previously (5). The total amount of active substance in solution is small because of the relatively slight solubility of nucleoprotein in sea water (11). The concentration is therefore rather easily brought to the threshold value of the jelly precipitation test. If, on the other hand, the same acid treatment is made with whole sperm (cf. METZ) the large bulk of nucleoprotein stored in the sperm nuclei is made accessible.

Moreover, it is possible that the basic proteins, which in certain respects are relatively sensitive, are directly damaged when treated for 4 hours at pH 0.8. In the preparation procedure of basic proteins described previously (5), the sperm were treated 10 minutes at pH 0.9–1.0.¹

Further evidence and conclusions

The electrophoretic studies of RUNNSTRÖM, TISELIUS & VASSEUR (12) cited by METZ (9) indicate that the sperm extracts according to FRANK (2) contain a single acidic substance. This substance contains phosphorus and has an absorption maximum at 2600 Å. The present writer has repeated these experiments and found a positive reaction for desoxyribonucleic acid. The active, acidic substance is nucleoprotein.

METZ relates one experiment according to which basic proteins and "antifertilizin" prepared by freeze-thawing neutralize each other completely. Unfortunately, the concentrations used in this experiment are not mentioned. In the European species investigated, purified nucleoprotein (11) solutions and "antifertilizin" preparations did not neutralize each other at any proportions. This was also true if purified basic proteins (5, 7) were substituted for nucleoproteins.

"Antifertilizin" and nucleoprotein were prepared from *Echinocardium cordatum* sperm according to the description above. These preparations as well as a solution of highly purified

¹ METZ also criticizes the cytoplasm extractions with citric acid used in the earlier experiments (5). If "antifertilizin" is considered resistant to a pH 3.5 treatment for one hour (preparation method [17]), it is, however, difficult to believe that the negative experiments using citric acid extraction (pH 3.7) are due to an inactivation of the factor. METZ recognizes FRANK's (2) preparations, obtained by heating sperm suspensions in sea water at 90° C as true "antifertilizin". This substance is not inactivated even by boiling (2).

Brissopsis lyrifera basic protein (7) were all diluted to a jelly precipitation titer of 1:4. They were mixed in the proportions 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. The precipitation titer 1:4 was found in all mixtures. Similar experiments were made with *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*.

Because of the egg-agglutinating and jelly-precipitating properties of the sperm nucleoproteins, which are easily released in small amounts into the surrounding sea water from injured sperm cells, experiments with extracts of anti-fertilizin must be interpreted very carefully. If it really is possible to extract sperm anti-fertilizin (species specific sperm-receptor) as a soluble egg-agglutinin and jelly-precipitin, the species specificity¹ criterion is still the only way to distinguish it from nucleoproteins, the active component of which is the basic proteins. It has, however, not been definitely demonstrated that the species specific sperm-receptor is a substance readily released from the sperm. Some evidence has previously (5, 6) been collected in support of the alternative hypothesis that this factor in the investigated species is a species-specific structure, a constituent of the sperm surface. In any case, so far this factor can be extracted from sperm only by treatments so hard that unspecific nucleoproteins are released at the same time (5).

SUMMARY

The spermatozoa of sea urchins are rich in nucleoproteins containing bound basic proteins. Traces of nucleoprotein are easily released from injured sperm cells into the surrounding sea water. These nucleoproteins agglutinate eggs and precipitate egg jelly by means of their basic protein groups. Free basic proteins isolated from the nucleoprotein complex agglutinate sperm tails as well.

Because of the species specificity of fertilization and sperm agglutination with egg-water, a species specific surface factor (sperm-receptor, sperm anti-fertilizin) has long been postulated. The writer has not been able to extract this factor without simultaneously releasing unspecific, egg-agglutinating nucleoproteins, which cover all specific reactions. If sperm anti-fertilizin (sperm-receptor) is supposed to be a soluble egg-agglutinin and jelly-precipitin, the only valid criterion when distinguishing it from unspecific nucleoproteins is still the species specificity. It would be unfortunate if properties of extracts containing nuclear material were summarily ascribed to sperm anti-fertilizin (sperm-receptor).

Acknowledgements: The investigation was carried out at the Zoological Stations of Naples and Kristineberg. The author wishes to express his deep gratitude to the Staffs of these Stations for laboratory facilities and materials. He is much indebted to Professor J. RUNNSTRÖM for keen interest and valuable suggestions.

From Wenner-Gren's Institute for Experimental Biology, Stockholm.

¹ For a discussion of "antifertilizin" specificity the reader is referred to TYLER's recent review (16). It is evident that sperm extracts obtained in the classical way by heating, freeze-thawing, or pH 3.5 extraction have very low, if any, species specificity in their reactions with eggs and egg jelly.

- REFERENCES. 1. **Elster, H. J.**, Arch. Entw. mechan., 133, 1 (1935). — 2. **Frank J. A.**, Biol. Bull., 76, 190 (1939). — 3. **Hartmann, M.**, Schartau, O. & Wallenfels, K., Biol. Zbl., 60, 398, (1940). — 4. **Hultin, T.**, Arkiv Kemi, Mineral., Geol., 24B, No. 12 (1947). — 5. **Hultin, T.**, Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 21, 153 (1947). — 6. **Hultin, T.**, Arkiv Zool., 40A, No. 12 (1948). — 7. **Hultin, T. & Herne, R.**, Arkiv Kemi, Mineral., Geol., 26A, No. 20 (1949). — 8. **Lillie, F. R.**, J. exptl. Zool., 16, 523 (1914). — 9. **Metz, C. B.**, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 70, 422 (1949). — 10. **Mudd, E. B. H., Mudd, S. & Keltch, A. K.**, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 26, 392 (1929). — 11. **Pollister, A. W. & Mirsky, A. E.**, J. gen. Physiol., 30, 101 (1946). — 12. **Runnström, J., Tiselius, A. & Vasseur, E.**, Arkiv Kemi, Mineral., Geol., 15A, No. 16 (1942). — 13. **Southwick, W. E.**, Biol. Bull. 77, 147 (1939). — 14. **Tyler, A.**, Proc. Nat. Acad. Sci., 26, 249 (1940). — 15. **Tyler, A.**, The Coll. Net, 18, No. 2 (1946). — 16. **Tyler, A.**, Physiol. Rev., 28, 180 (1948). — 17. **Tyler, A., & O' Melveny, K.**, Biol. Bull., 81, 364 (1941). — 18. **Vasseur, E.**, Acta Chem. Scand., 2, 900 (1948).

Tryckt den 18 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Note on the 'Karyolytic effect' of certain rat sera

Attempts to provoke 'Karyolysis' by active immunization

By HANS V. EULER and LEO HELLER

Our investigations on karyolysis were undertaken in connection with our studies on the FREUND-KAMINER reaction (this Arkiv 1: 8, 1949).

The experiments reported in our first paper on this subject gave no indication for the existence of regular and reproducible differences between the lipolytic action of normal and cancerous sera on lipid extracts.

In an earlier paper of this series (1) the authors described a rather peculiar effect which the incubation of mouse ascites carcinoma or rat Jensen sarcoma (smear preparations) with certain (normal as well as sarcomatous) rat sera had on the stainability of the tumor cells studied. This effect, consisting of a distinct loosening of the internal structure of the nuclei, when stained by combined MAY-GRÜNWALD and GIEMSA stains and of a total loss of stainability by FEULGEN nuclear stain, has by the authors been called the 'karyolytic effect' of rat serum.

Subsequent studies (2) demonstrated that the above effects of rat blood serum on the cell nuclei are not limited to the transplantable mouse resp. rat tumor cells originally studied (1), but can also be found when incubating a high percentage of available normal or sarcomatous rat sera with similarly prepared smears of rat liver pulp. Simultaneously tested human blood sera of apparently healthy subjects did not show the same effect (2), and the smears incubated with them, after the incubation showed the same stainability as controls, treated with the Ringer solution, distinctly remaining Feulgen-positive, even after a prolonged treatment with human serum or with non-karyolytic specimens of rat sera.

The loss of the stainability with FEULGEN nuclear stain and the loosening of the structure of cell nuclei at panoptical (= MAY-GRÜNWALD-GIEMSA) staining were interpreted by the authors as probably due to some enzymatic factor present in the rat sera displaying the karyolytic effect by dissolving a part of the nuclear substance, probably the desoxyribonucleic acid. We were able to discard the possibility that the enzyme responsible for the effect observed had its origin not in the blood serum but in the erythrocytes; for the intensity of the phenomenon showed no correlation to the degree of the hemolysis of the serum tested, and hemolysed human sera did not show any similar action.

The above facts constitute a rather strong bulk of arguments speaking against a tentative interpretation of the karyolysis as a manifestation of heterology, as of a kind of defense mechanism directed against foreign cells. Such an

interpretation would, of course, agree pretty well with the mechanism of the carcinolytic reaction as postulated many years ago by FREUND and KAMINER (3) and supported by many others (4), but the authors wished to stress the fact that they did observe the karyolysis (in the sense as described above) as yet only when letting certain rat sera (normal as well as sarcomatous) act on both homologous and heterologous, normal and sarcomatous cells.

Using different techniques, recommended by their respective authors who had tried the righteousness of the theory by FREUND-KAMINER (5, 6, 7), we have been unable to demonstrate any unequivocal differences between the action of normal and sarcomatous rat sera on tumor cells or tumor extracts (8). Working with animal tumors of the kinds generally not giving metastases, the authors were not able to strictly follow the original technique of FREUND (9), such as described for human material, and thus our negative results do not invalid the statements of the Viennese authors, essentially concerning the human cancer. The method of tumor cell counting, however, when applied to suspensions of mouse ascites carcinoma (MAC) cells, incubated with human (10) or rat (8) sera, failed to differentiate between the normal and neoplastic sera. In our experiments (8) we found no lytic effect of rat or human sera on MAC-cells, when tested using the cell-counting method.

In search of a more sensitive technique, which would possibly allow to obtain such a differentiation, among others, the authors also tried the technique of incubating fixed tumor or liver smears with different sera. This technique, used in the present series of investigations, and exhaustingly described in our earlier papers (1, 2), is a modification of the technique of A. HIRSCHFELD (11), who reported favourable results as regards the possibility differentiating between human normal and cancer sera.

While we were not able to confirm the results of HIRSCHFELD (whose cytological terminology besides does not fit any more the current use) on an animal tumor material, the use of a cytological and perhaps partly cytotechnical (FEULGEN nuclearstain)-technique rendered the study of serum action on the different parts of the cell possible, thus allowing us to observe the characteristic effects of the majority of tested rat sera on the cell nuclei, described above under the name of the 'karyolytic effect'.

Being aware of possible well-founded objections, regarding the right to ascribe an eventual biological importance to results obtained when using fixed cellular material as substrate for the action of serum, the authors tested the results previously obtained (1, 2) (and summarized above) using a modified technique, allowing to study the cytological effects of incubating suspensions of unfixed, fresh cells with the sera tested (as in the FREUND-KAMINER test) with subsequent fixing and staining of the serum-treated cells. The mouse ascites carcinoma¹ (MAC), naturally existing in the form of a suspension of free individual tumor cells, constituted the given cellular material for that type of study. The use of that tumor allows to eliminate the disturbing effects of mechanical cell damage, unavoidable with every attempt to prepare a suspension of free organ cells and rendering an adequate practical performance of the carcinolytic reaction so extremely difficult a task (4, 12).

¹ We are strongly indebted to Dr. C. DITTMAR (Frankfurt a. M.) for the extremely virulent strain of the mouse ascites carcinoma (MAC) which he kindly supplied us with.

Description of the modified technique

Ascitic fluid, obtained by puncturing the abdominal cavity of MAC-mice on ca. the 7th-10th day after the intraperitoneal inoculation of the mouse with 0.05 ml of passage ascitic fluid¹, was centrifuged 5 minutes at low speed to sediment the tumor cells, the supernate decanted and the packed cells resuspended in approximately the original volume (or little less) of Ringer isotonic salt solution. The cell suspensions obtained were used either directly or after repeated (5-6fold) washing with the Ringer solution, tending to eliminate any inhibiting factors, eventually present in the ascitic fluid (2, 13).

However, no significant differences were found when testing parallelly washed and unwashed MAC-cells with the same 'karyolytic' and 'non + karyolytic' sera, and the procedure of the repeated washing of the cells was therefore abandoned in the later experiments.

Amounts of 0.05 ml of the above cell suspensions were incubated over night in small test-tubes with 1.0 ml amounts of the tested sera at the temperature of 37° C. The sera were used undiluted. The sterility of the samples during prolonged incubation at 37° was attained by performing the incubation in an atmosphere of chloroform vapours. No gross bacterial contamination is usually found at microscopical examination when following such a procedure.

After the incubation the tubes were centrifuged at low speed, the supernates sucked off and the cells washed once with Ringer solution and recentrifuged with the purpose of performing the subsequent staining in precisely the same milieu.

Smear preparations were made with the cellular sediment (double slides were used for each tube). Fixing with absolute methanol 3 minutes, then staining, as previously described (1, 2).

Experimental

The results, obtained with the aid of the described modified technique, in which the sera were allowed to act on unfixed and on probably partly still living, mouse ascites carcinoma cells, showed an almost perfect agreement with the previously described (see above). Out of a quantity of human, rabbit and rat sera tested, only c. $\frac{2}{3}$ was found positive, and the latter showed typical and reproducible effects on the subsequent staining of the cell nuclei, as described for the fixed preparations (1,2). All the human (together 9 sera from apparently healthy subjects of either sex) and the 3 rabbit sera tested gave no such effect and the cells treated with them stained in approximately the same way (both panoptically and with Feulgen) as simultaneously made control-preparations, treated with Ringer solution or with the ascitic fluid supernate, proving strongly Feulgen-positive and compactly and intensively staining with May-Grünwald-Giemsa.

Immunization experiments

The above results, while unequivocally demonstrating the presence of a 'karyolytic' principle, acting probably on the desoxyribonucleic acid of the cell

¹ See foot-note p. 2.

nuclei, in the majority of normal and sarcomatous rat sera, and the lack of a similar principle (or rather activity) in normal human and rabbit sera, did not, however, yield much information regarding the nature of the lytic factor concerned. Quite generally, two ways of approach appeared possible: the enzymatic or the immunologic. The fact, that the rat serum factor attacks as well the nuclei of heterologous (MAC) as those of homologous (rat liver) cells seemed to preclude a serological character of the phenomenon. However, the lack of correlation of the effect observed with any known simple characteristic of the rats, the serum of which exhibited the karyolytic property, as the sex, age or tumor pathology, let presume some genetic differences between apparently identical animals, differences, possibly analogous to blood group differences existing in man or animal (14). A metabolically important enzyme, having a physiological role to perform, can by no means display a fancy distribution in different individuals of the same species, but such a distribution may perfectly well fit the existence of a genetically bound natural antibody, which in such a case could be tentatively called 'isokaryolysin'.

The more recent trends in the field of immunology and serology do not exclude the possibility of an enzymatic character of at least a part of serological reactions—such a synthetic interpretation, however, lies beyond the limits of the experimentally established facts.

It seems to the authors, that the same 'sero-cytological' technique, which has rendered possible the recognition of the 'karyolytic' effect of certain rat sera (1, 2), might perhaps prove useful also for detecting the presence in serum of specific antibodies, produced by immunization of the test animal with an extract from the tissue used as the substrate of 'karyolysis'-reaction. An eventual positive result of such an experiment, i. e. the eventual appearance of the 'karyolysin' in a previously negative serum after immunization, should be of a rather high theoretical importance for the general knowledge of the nature of antibodies.

Up to now, we can report only about negative results of the first preliminary experiment of that kind. Three rabbits, whose sera did not display any observable effect on the morphological and staining characters of rat liver cell nuclei (fixed smears) or MAC-nuclei, were immunized by repeated intramuscular injections of increasing doses of homogenized rat liver in physiological saline. The rabbits received together 4 injections of rat liver given at intervals of 4–5 days. The serum of the immunized animals, obtained by heart puncture, was tested together with non-immune rabbit serum, using methanol-fixed rat liver smears as substrate. No karyolytic effect was observed, the immune and non-immune rabbit serum showing the same lack of any distinct action on the nuclei of rat liver cells.

Precipitin tests, performed with the same immune rabbit sera and with rat liver extracts (clarified by half an hour's centrifugation at 10.000 r. p. m.) as antigen, using different dilutions of both serum and antigen (for the technique used compare (15)), yielded, however, rather low precipitin titers (up to 1/32 at high antigen dilutions). The degree of immunization of the rabbits against rat liver material therefore proving to be very low, no absolute validity can be ascribed to the negative results of the 'karyolysin'-tests, which need a repetition with strong hyperimmune anti-rat liver rabbit sera.

We hope soon to be able to report something more positive about that important problem as well as about the nature of the 'karyolytic' factor demonstrated by us in a high proportion of tested albino rat sera.

The work described in this paper was carried out with the financial support of the FRED. E. A. PEARSON Foundation, New York.

Stockholm, University, Vitamin Institute.

REFERENCES. 1. **H. v. Euler, Leo Heller and C. Curman**: Arkiv f. Kemi 11 Maj. — 2. —: Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 1, Nr 36 (1949). — 3. **E. Freund and G. Kammer**: Bioch. Ztschr. 26, 312 (1910); Biochemische Grundlagen der Disposition f. Karzinom (Wien 1925). — 4. Compare e. g. **K. Stern and R. Willheim**: The Biochemistry of Malignant Tumors (New York 1943) — 5. **R. Willheim and K. Stern**: Bioch. Ztschr. 239: 473 (1931). — 6. —: Wien. Klin. Wchschr. 43: 227 (1930); 44: 728 (1931). — 7. **M. W. Mettenleiter**: Boll. Liga Contra el Cancer, 13: 165 (1938); Nature, 145: 305 (1940). — 8. **H. v. Euler, L. Heller and C. Curman**: Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd 1 Nr 8 (1949). — 9. **E. Freund in Barrenschenn-Willheim**: Die Laboratoriumsmethoden der Wiener Kliniken (Wien 1928) S. 370 ff. — 10. **A. v. Wacek and E. Pesta**: Ztschr. f. Krebsforschg. 46: 211 (1937). — 11. **A. Hirschfeld**: Arch. de l'Inst. Prophyl. 8: 207 (1936). — 12. **P. Rondoni**: Il Cancro, Casa Ed. Ambrosiana, Milano). — 13. **N. Waterman**: Wien, Med. Wochenschr. 85: 405 (1945). — 14. **R. Doerr**: Die Immunitätsforschung in Einzeldarstellungen. Bd 2. T. 2, Die Antikörper (Wien 1949). — 15. **E. Kabat and M. Mayer**: Experimental Immunochemistry (New York 1948).

Tryckt den 22 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Om xanthogenhydrazider og xanthogenhydrazoner

Af JÖRGEN WANGEL

1. Oversigt

På forslag af professor B. HOLMBERG og som et led i en af denne iværksat undersøgelse over thiocarbhydrazider¹ har forfatteren omsat nogle xanthogeneddikesyrer i form af deres alkalisalte i vandig opløsning med hydrazin. Efter forventning og i overensstemmelse med skemaet:



er derved de tilsvarende xanthogenhydrazider opstået, og efter hvad forfatteren senere har fundet, kan man også få disse stoffer ved reaktion mellem hydrazin og xanthogenaterne selv, uden at behøve at gå omvejen over deres eddikesyrederivater.

De xanthogenhydrazider, som hidtil er fremstillet, er *ethylxanthogenhydrazidet*, som man har fået som en olie, der ikke uden kendelig destruktion lader sig destillere ved 0,2 mm's tryk, samt *benzylxanthogenhydrazidet*, som er fast og har smp. 60°–62°. Begge stoffer er amfiprote og derfor opløselige i såvel stærkt alkaliske som sure vandige opløsninger. Af salte med syrer er især ethylxanthogenhydrazidets hydroklorid let at fremstille og bekvemt som opbevaringsform for dette hydrazid.

Såfremt der ved reaktionen med hydrazin findes overskud af xanthogeneddikesyren, reagerer denne med det dannede xanthogenhydrazid, så at der dannes et symmetrisk dioxanthogenhydrazid. På denne måde er *1,2-diethyl-* og *1,2-dibenzylxanthogenhydraziderne* fremstillet med smp. 60°–62°, resp. 118°–119°,5, og ved reaktion mellem ethylxanthogeneddikesyre og benzylxanthogenhydrazid samt mellem benzylxanthogeneddikesyre og ethylxanthogenhydrazid: *1-ethylxanthogen-2-benzylxanthogenhydrazid*, smp. 87°–88°. På samme måde har man af ethyl-, resp. benzylxanthogenhydrazid og benzoylthioglykolsyre fået *1-ethylxanthogen-2-benzoylhydrazid* med smp. 152°–154°, resp. *1-benzylxanthogen-2-benzoylhydrazid* med smp. 134°,5–136°, medens ved reaktion mellem ethylxanthogenhydrazid og thiobenzoylthioglykolsyre det primært dannede *1-ethylxanthogen-2-thiobenzoylhydrazid* spontant afspalter svovlbrinte, så at man som reaktionsprodukt får samme *2-ethoxy-5-fenyl-1, 3, 4-thiodiazol* som HOLMBERG² tidligere har fået af thiobenzhydrazid og ethylxanthogeneddikesyre.

Ved reaktion mellem fenylylhydrazin og ethyl-, resp. benzyl-xanthogeneddikesyre er fremstillet *1-ethylxanthogen-2-fenylylhydrazid* med smp. 69°–70°³, resp. *1-benzylxanthogen-2-fenylylhydrazid* med smp. 134°,5–136°,5.

¹ Arkiv för kemi, mineral. o. geol., 17 A. N:o 23 (1944), og 25 A. N:o 18 (1947).

² HOLMBERG (1947), cit. side 1.

³ Dette hydrazid er tidligere fremstillet af H. L. WHEELER og B. BARNES (Amer. chem. J. 24, 65 (1900)) ved ophedning af ethylxanthogensyreethylester og fenylylhydrazin. De opgiver smp. 72°–74°.

I almindelighed reagerer ethyl- og benzylxanthogenhydraziderne let med aldehyder og ketoner under dannelse af krystalliserende hydrazoner, af hvilke følgende er fremstillet:

Ethylxanthogenhydrazon		Benzylxanthogenhydrazon	
af:	smp.	af:	smp.
formaldehyd	56° – 58°	acetaldehyd	112°,5–113°,5
acetaldehyd	85°,5– 89°,5	benzaldehyd	124° –125°,5
benzaldehyd	100° –102°	salicylaldehyd	173°
furfural	128°,5–129°,5	anisaldehyd	124°,5–125°,5
methylethylketon	68° – 70°	p-nitrobenzaldehyd	160° –166°
pyrdruesyre	141° –143°	furfural	120° –121°,5
levulinsyre	135° –136°,5	acetone	65°,5– 68°
cyclohexanon	99° –100°,5	methylethylketon	69° – 70°
acetofenon	101° –102°,5	acetylacetone, mono-	85°,5– 87°,5
benzofenon	104°,5–106°,5	acetylacetone, di-	126°,5–128°,5
		pyrdruesyre	135°,5–136°,5
		levulinsyre	118° –119°
		cyclohexanon	77° – 78°
		acetofenon	107°,5–109°,5
		fenylacetone	82° – 84°
		anisylacetone	89° – 91°
		benzil, mono-	126° –127°

Af ethylxanthogenhydrazid og acetone opstod ikke den enkle hydrazon, men derimod *isopropyliden- bis -ethylxanthogenhydrazid* med smp. 59°,5–61°,5. Forsøg på at få krystallinske produkter af ethylxanthogenhydrazid og nogle simple kulhydrater lykkedes ikke.

Foreliggende undersøgelse er startet efteråret 1946 på Kungl. Vetenskapsakademien's Nobelinstituts afdeling för organisk kemi og fra foråret 1947 fortsat på A. B. Pharmacias forskningslaboratorium, hvor medarbejdere ved experimentalanalyselaboratoriet har udført de med (Ph) betegnede forbrændingsanalyser under ledelse af diplomingeniør MAJ B. SVENDSEN.

2. Ethylxanthogenhydrazider og ethylxanthogenhydrazoner

A. Ethylxanthogenhydrazid

Af 32,4 g med 2-n natriumhydroksyd neutraliseret etylxanthogeneddikesyre og 9 g hydrazinhydrat opstod en homogen blanding, som snart emulgeredes og udskilte en gullig olie. Følgende dag afsepareredes 14 g, som efter tørring over smeltet calciumklorid destilleredes for oliepumpe. 12,5 g olie gav herved på 10 minutter, under stigning af trykket fra 0,2 til 0,5 mm og af temperaturen i dampene fra 105–120°, 9,2 g svagt rosafarvet destillat og 2,9 g tyktflydende rest. Destillatet viste $d_4^{15,5} = 1,191$ og bestod efter analysen at dømme af rent ethylxanthogenhydrazid.

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHNH_2 = C_3H_8ON_2S$ (120,17):

ber.:	C 29,98,	H 6,71,	N 23,31,	S 26,68 %.
fund.:	» 30,24,	» 6,65,	» 23,07,	» 26,71 ».

I löbet af nogle timers opbevaring skiftede hydrazidet fra rødlig til gullig farve, men ved fortsat opbevaring blev det efterhånden atter rødt og med tiden mere og mere tyktflydende, hvorfor det passende opbevares i form af det nedenfor beskrevne hydroklorid.

I overensstemmelse med sin konstitution er ethylxanthogenhydrazidet en amfolyt, men bade som syre og base kun ganske svag. Ved titrering af 0,1142 g stof i 20 ml 50 %-ig sprit mod metylrødt opstod skarpt omslag allerede med 2 dråber 0,1-n natronlud, og titrering mod fenoltalein umuliggjordes af, at hydrazidet også uden fenoltalein gav rødfarvning i alkalisk opløsning. — Ved forsøg på jodometrisk titrering brugte hydrazidet i 50 %-ig sprit mere end et ækvivalent jod, uden at noget holdbart omslag kunde fås, medens i eddikesyreopløsning et glidende omslag fremkom efter tilsætning af ca. 1/3 af den beregnede jodmængde, og i vandig saltsur opløsning praktisk talt intet jodforbrug fandt sted.

Fremstillingen af ethylxanthogenhydrazidets *hydroklorid* skete først således, at en af 36 g ethylxanthogeneddikesyre i tilsvarende mængde 2-n natriumhydroksyd og 10 g hydrazinhydrat tilberedt reaktionsblanding næste dag ekstraheredes med 100 ml ether, hvorefter etheropløsningen ekstraheredes med 40 ml 5-n saltsyre. Ved inddampning af den således opståede vandige opløsning i vakuum over svovlsyre vandtes 20 g farveløse prismar med smp. 139°–140° (under gasudvikling) og ækivalentvægt 157,6 (mod methyldrødt).

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHNH_3Cl = C_3H_9ClN_2S$ (156,63):

ber.:	Cl 22,64,	N 17,89,	S 20,47 %,
fund.:	» 22,61,	» 17,82,	» 20,53 ».

Ved et senere forsøg sattes til en opløsning af 16 g kaliumxanthogenat i 20 ml vand 6 ml hydrazinhydrat. Herved opstod en klar, gul opløsning, som snart begyndte at emulgeres som ovenfor beskrevet. 12 timer senere ekstraheredes blandingen med sammenlagt 50 ml ether, etheropløsningen udrystedes med 20 ml 5-n saltsyre og den herved dannede hydrokloridopløsning inddampedes i vakuum ved højst 50°, hvorved man fik 13,2 g salt, svarende til et udbytte på 85 %. Dette produkt smeltede ligeledes under gasudvikling, men ved 140°–141°, og gav mod methyldrødt ækivalentvægt 157,3, ber. 156,6.

Det *normale sulfat* fremstilledes ved, at 5 ml 2-n svovlsyre sattes til en opløsning af 1,2 g ethylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit, hvorefter man lod den opståede, klare opløsning frivilligt inddampe til 4 g:s vægt. De herved udskildte smalle tavler og efflorescencer tørredes på lertallerken, hvorefter de vejede 0,65 g og ved opvarmning delvis og under destruktions smeltede ved ca. 158°.

For $(C_2H_5O \cdot CS \cdot NHNH_3)_2 : SO_4 = C_6H_{18}O_6N_4S_3$ (338,42):

ber.:	N 16,56,	S 28,42 %;	fund.:	N 16,42,	S 28,61 %.
-------	----------	------------	--------	----------	------------

Dette salt opstod ligeledes, da man på samme måde omsatte 1,2 g ethylxanthogenhydrazid med 11 ml 2-n svovlsyre. Udbyttet blev her 1,2 g, destruktionspunktet ca. 150°, og ved analyse gav saltet 16,28 % N og 28,49 % S.

B. 1,2-Diethylxanthogenhydrazid

Da 5 g hydrazinhydrat sattes til en opløsning af 36 g ethylxanthogeneddikesyre i ækivalent mængde 2-n natriumhydroksyd, opstod hurtigt en emulsion, som til næste dag udskildte en viskøs olie. Efter podning med krystaller fra et forforsøg

udskildte blandingen i isskab 14 g stavformede prismes med smp. 54°,5–58°, og moderluden herfra gav efter 4 dages opbevaring ved stuetemperatur yderligere 3,3 g krystaller med samme smp. 3 g af råproduktet gav efter opløsning i 3 ml benzen og udfældning heraf med 10 ml petroleumether i isskab 2,5 g prismes med smp. 60°–62° og diethylxanthogenhydrazidets sammensætning:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHNH \cdot CS \cdot OC_2H_5 = C_6H_{12}O_2N_2S_2$ (208,30):

ber.:	C 34,59,	H 5,81,	N 13,45,	S 30,78 %,
fund.:	» 34,81,	» 5,77,	» 13,65,	» 30,72 %.

Dette hydrazid forholder sig som en enbasisk syre ved titrering mod fenolftalein. Således gav en opløsning af 0,2097 g hydrazid i 20 ml sprit og 10 ml vand mod denne indikator godt omslag med 10,14 ml 0,0999-n natriumhydroksyd, svarende til ækvi-
valentvægt 207,0 mod ber. 208,3.

C. 1-Ethylxanthogen-2-benzoylhydrazid

Ved tilsætning af 3,2 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid i 20 ml sprit, neutraliseret med 10 ml 2-n natriumhydroksyd, til 4 g efter B. HOLMBERG¹ fremstillet benzoylthioglykolsyre, neutraliseret med 10 ml 2-n natriumhydroksyd, opstod en klar blanding, som i åbent bager til næste dag dannede en grød af hvide nåle, efter afsugning, vaskning med vand og tørring i luften 1,2 g med smp. 152°–154°. Ved omkrystallisation af 1 g af dette produkt af 50 ml benzen fik man 0,8 g nålformede krystaller med uforandret smp. Ved titrering af 0,2396 g af disse i 30 ml 65 %-ig sprit mod fenolftalein fik man et svagt omslag med 10,70 ml 0,1002-n natriumhydroksyd, svarende til ækvi-
valentvægt 223,5 mod beregnet 224,3. Ved analyse viste stoffet sig at være 1-ethylxanthogen-2-benzoylhydrazid:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHNHCOC_6H_5 = C_{10}H_{12}O_2N_2S$ (224,28):

ber.:	C 53,55,	H 5,39,	N 12,49,	S 14,29 %,
fund:	» 53,59,	» 5,32,	» 12,59,	» 14,62 %.

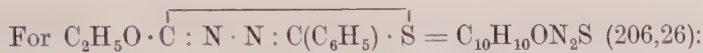
Moderluden fra råproduktet gav ved henstand i åbent bager i løbet af en uge sammenlagt 2,4 g merudbytte med smp. 150°–154°.

D. 2-Ethoxy-5-fenyl-1,3,4-thiodiazol

Til en af 3,1 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid, 4 ml sprit og 10 ml 2-n natriumhydroksyd fremstillet opløsning sattes 4,2 g thiobenzoylthioglykolsyre neutraliseret med 10 ml 2-n natriumhydroksyd. Herved opstod en klar, rød opløsning, som snart begyndte at udvikle svovlbrinte og efter ca. 15 minutter at emulgeres og udskille olie. Efter podning med krystaller fra et forforsøg og et døgn's opbevaring ved stuetemperatur fandtes voluminøs udfældning af nålformede krystaller og vædsken var nu kun svagt rosa. Efter afsugning, vaskning med vand og tørring i luften fik man 3,9 g gullige krystaller med smp. 66°–68°. Ved omkrystallisation af 3,5 g heraf af 100 ml petroleumether fik man 2,15 g farveløse nåle, som efter sint-ring ved 67° smeltede ved 67°,5–68°, i blanding med HOLMBERG's² præparat ved 68°–69°, og som viste sig at være analyseren ethoxy-fenylthiodiazol.

¹ B. HOLMBERG (1944) cit. side 1.

² B. HOLMBERG (1947) cit. side 1.



ber.: C 58,23,	H 4,89,	N 13,58,	S 15,54 %.
fund. ¹ : » 58,04,	» 4,74,	» 13,74,	» 15,60 ».

E. 1-Ethylxanthogen-2-fenylhydrazid

Af 9,0 g ethylxanthogeneddikesyre, neutraliseret med 25 ml 2-n natriumhydroksyd, og 5 ml fenyldiazin i 50 ml vand opstod en klar opløsning, som snart emulgeredes og udskilte gullig olie. En dråbe af olien blev revet med saltsyre og udskilte krystaller, hvormed reaktionsblandingen podedes. Efter et døgn ved stuetemperatur, af-sugning, vaskning med vand og tørring i luften gav denne 8,9 g farveløse krystal-nåle, der smeltede ved 68°–69°,5. Ved stuetemperatur opløstes 1 g af råproduktet klart i 10 ml benzen, opløsningen ændredes ikke ved tilsætning af 10 ml petroleum-ether, men ved afkøling til –4° i 6 timer udskiltes 0,65 g krystallnåle med smp. 69°–70°, opløselige i 0,1-n natriumhydroksyd, hvoraf de atter udfældes med saltsyre.



ber. : C 55,07,	H 6,16,	N 14,28,	S 16,33 %.
fund. ² : » 55,29,	» 6,10,	» 14,28,	» 16,25 ».

F. Aldo-ethylxanthogenhydrazoner

Da 1,0 g *formalin*, fortyndet med 4 ml vand, sættes til en opløsning af 1,2 g ethyl-xanthogenhydrazid i 5 ml sprit opstod en klar blanding, som nogle minutter efter blev svagt rosa og ca. en time senere begyndte at emulgeres og udskille en olie. 3 dage efter afdekanteredes vandfasen og olien behandledes med 11 ml 1-n natrium-hydroksyd, hvorved den så godt som fuldstændigt gik i opløsning for atter at ud-fældes som olie, da opløsningen gjordes sur. I løbet af 4 dage gik denne olie imidler-tid over i 0,6 g farveløst krystalpulver, som ved 56°–58° smeltede til en tyktflydende masse, og som viste formaldehyd-ethylxanthogenhydrazonens sammensætning:



ber.: C 36,34,	H 6,10,	N 21,20,	S 24,26 %.
fund.: » 36,68,	» 5,97,	» 21,69,	» 23,89 ».

Ved forsøg på at fremstille samme hydrazon ud fra en vandig opløsning af ethyl-xanthogenhydrazidets hydroklorid fremkom en klistret masse, som det ikke lykke-des at få krystallinsk.

Efter at en blanding af 1,2 g ethylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og 5 g af en 10 %-ig vandig opløsning af *acetaldehyd* havde stået et døgn ved stuetemperatur, gav den ved frivillig inddampning en rosa krystalgrød, som på lertallerken efterlod 1,35 g krystalpulver med smp. 85°,5–89°,5. Ved fældning af en benzenopløsning med petroleumether fik man den således opståede acetaldehyd-ethylxanthogenhydrazon i form af store, grålige prismer med smp. 84,5°–89°.



ber.: C 41,08,	H 6,89,	N 19,16,	S 21,93 %.
fund.: » 40,96,	» 6,82,	» 19,43,	» 22,11 ».

¹ af frøken MAJBRITT LINDSTRÖM.

² C og H af (Ph), N og S af frøken MAJBRITT LINDSTRÖM.

Noget krystalliserende produkt fremkom heller ikke her, da ethylxanthogenhydrazidet anvendtes i form af hydroklorid.

Ved blanding af opløsninger af 1,1 g *benzaldehyd* i 5 ml sprit og 1,6 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid i 5 ml vand opstod straks og under svag varmeudvikling en emulsion, som udskilte en gullig olie. Denne gik snart over i en masse af 1,9 g korte, skråt afskårne prismen med smp. 100° – $101^{\circ},5$, som efter udfældning med vand af spritopløsning smeltede ved 100° – 102° og ved analyse gav:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : CHC_6H_5 = C_{10}H_{12}ON_2S$ (208,28):

ber.:	C 57,66,	H 5,81,	N 13,45,	S 15,39 %,
fund.:	» 57,86,	» 5,79,	» 13,68,	» 15,52 ».

Af reaktionsäkvivalente mængder ethylxanthogenhydrazid og benzaldehyd i alkoholopløsning fik man efter 2 dages opbevaring ved frivillig indampning så godt som kvantitativt udbytte af benzaldehyd-ethylxanthogenhydrazon med smp. 97° – $99^{\circ},5$.

Af 1,6 g ethylxanthogenhydrazid-hydroklorid i 5 ml vand og 1 g nydestilleret *furfural* i 5 ml sprit fremkom under moderat varmeudvikling med det samme en grød af smalle prismen, som næste dag blev afsuget og tørret i luften, hvorefter de vejede 1,85 g og smeltede ved $127^{\circ},5$ – $128^{\circ},5$. Efter omkrystallisation af benzen smeltede den således opståede *furfural*-ethylxanthogenhydrazon ved $128^{\circ},5$ – $129^{\circ},5$ og gav ved analyse:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : CHC_4H_3O = C_8H_{10}O_2N_2S$ (198,24):

ber.:	C 48,47,	H 5,08,	N 14,13,	S 16,17 %,
fund.:	» 48,30,	» 5,04,	» 14,22,	» 16,52 ».

Ved forsøg på reaktion mellem ethylxanthogenhydrazidet og mannose, resp. galaktose fremkom ikke krystalliserende produkter.

G. Keto-ethylxanthogenhydrazoner

Af 1,2 g ethylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og 0,7 g *acetone* i 5 ml vand opstod en klar, snart svagt rosa opløsning, som næste dag var uforandret og derpå ved frivillig indampning efterlod 1,5 g farveløse, men i visse partier rødtligt misfarvede, silkeglinsende nåle med smp. $53^{\circ},5$ – 58° . Til en opløsning af 1,2 g heraf i 4 ml benzen sattes 20 ml petroleumether, og i isskab til næste dag udskildte blandingen 0,6 g smalle, farveløse prismen med smp. $59^{\circ},5$ – $61^{\circ},5$, som dog ikke viste den forventede *acetone*-ethylxanthogenhydrazon's sammensætning, men bestod af *isopropyliden-bis-ethylxanthogenhydrazid*:

For $(C_2H_5O \cdot CS \cdot NHNH)_2 : C(CH_3)_2 = C_9H_{20}O_2N_4S_2$ (280,40):

ber.:	C 38,54,	H 7,19,	N 19,98,	S 22,88 %,
fund.:	» 38,57,	» 7,10,	» 20,10,	» 22,71 ».

Af 1,2 g ethylxanthogenhydrazid og 0,72 g *methylethylketon* opstod som ved *acetone* 1,55 g råprodukt, som efter opløsning i 4 ml benzen og udfældning heraf med 20 ml petroleumether gav 0,8 g prismatiske nåle med smp. 68° – 70° og *methylethylketon*-ethylxanthogenhydrazonens sammensætning:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)C_2H_5 = C_7H_{14}ON_2S$ (174,26):

ber.:	C 48,24,	H 8,10,	N 16,09,	S 18,40 %,
fund.:	» 48,50,	» 8,08,	» 16,34,	» 18,47 ».

Af 4,7 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid i 15 ml vand og 2,7 g *pyrodruesyre* i samme mængde vand opstod hurtigt en grød af små, farveløse nåle, som følgende dag efter afsugning og tørring i luften vejede 6,0 g, smeltede ved 139° – 140° under gasudvikling og mod methylrødt viste äkvivalentvägt 210. Ved tørring over fosforsyreanhydrid i vakuum tabte dette produkt 10,3 % i vägt, beregnet for et mol. H_2O 8,65 %, hvorefter det smeltede ved 141° – 143° og ved analyse gav:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)COOH = C_6H_{10}O_3N_2S$ (190,22):

ber.:	C 37,88,	H 5,30,	N 14,73,	S 16,85 %,
fund.:	» 37,84,	» 5,31,	» 14,90,	» 17,15 ».

Mod methylrødt viste det törrede produkt äkvivalentvägt 188,0, ber. 190,2, medens det mod fenoltalein gav et svagt omslag for en til äkvivalentvägt 142 svarende mængde natriumhydroksyd.

Da man til en oplösning af 4,7 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid i 15 ml vand satte 3,5 g *levulinsyre* i 5 ml vand, opstod en klar blanding, som efter 12 timer ved stuetemperatur havde udskilt farveløse krystalskäl, efter vaskning med vand og tørring i luften 2,1 g med smp. 135° – $136^\circ,5$ og med äkvivalentvägt 222 mod methylrødt. Moderluden gav derefter ved frivillig inddampning en gullig, sirupös vädske, som ikke krystalliserede efter podning med ovenomtalte krystaller. Ved omkrystallisation af 1,5 g af disse af 15 ml benzen fik man 1,0 g skäl med smp. 133° – 135° , som viste levulinsyre-ethylxanthogenhydrazonens sammensätning:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)CH_2CH_2COOH = C_8H_{14}O_3N_2S$ (218,27):

ber.:	C 44,02,	H 6,47,	S 14,69 %,
fund. (Ph):	» 44,25,	» 6,41,	» 14,74 ».

Mod methylrødt gav 0,2007 g et noget uskarpt omslag med 9,10 ml 0,1001-n natriumhydroksyd, svarende til äkvivalentvägt 220,3 mod ber. 218,3.

Af 1,25 g ethylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og 1,0 g *cyklohexanon* i samme mængde sprit opstod en klar, snart svagt rosa oplösning, som på 4 dage ved stuetemp. intet udskilte, men derefter ved frivillig inddampning efterlod 2 g silkeglinsende nåle med smp. 97° – 99° , efter udfäldning med 10 ml petroleumether af 3 ml varm benzen 1,45 g med smp. 99° – $100^\circ,5$ og med cyklohexanon-ethylxanthogenhydrazonens sammensätning:

For: $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : C_6H_{10} = C_9H_{16}ON_2S$ (200,29):

ber.:	C 53,96,	H 8,05,	N 13,99,	S 16,01 %,
fund.:	» 54,20,	» 8,00,	» 13,93,	» 16,12 ».

Af 1,2 g ethylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og 1,2 g *acetofenon* i samme mængde sprit opstod en klar, snart svagt rosa oplösning, som til näste dag var uforandret og da efter tilsätning af 10 ml vand udskilte 1,9 g farveløse, silkeglinsende nåle med smp. $100^\circ,5$ – $101,5^\circ$. Ved udfäldning af disse med 10 ml petroleumether af 4 ml benzen fik man 1,7 g prizmer, som ved 101° – $102^\circ,5$ gik over i en tyktflydende masse, og som ikke ändredes ved omkrystallisation af benzen. Produktet viste acetofenon-ethylxanthogenhydrazonens sammensätning:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)C_6H_5 = C_{11}H_{14}ON_2S$ (222,3):

ber.:	C 59,43,	H 6,35,	N 12,61,	S 14,42 %,
fund.:	» 59,58,	» 6,29,	» 12,78,	» 14,40 ».

Ved sammenblanding af en opløsning af 1,6 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid i 5 ml vand og en af 1,2 g acetofenon i 5 ml sprit opstod hurtigt en hvid grød af 1,7 g krystalnåle med smp. 100° – 102° .

En blanding af 4,73 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid i 15 ml sprit og 5,46 g *benzofenon* i 90 ml sprit farvedes lidt efter lidt gul, men ændredes ellers ikke til næste dag. Efter tilsætning af 50 ml vand udskildte den da 5,2 g prismatiske krystaller med smp. 99° ,5– 103° . Af råproduktet opløstes 5,1 g i 5 ml svagt opvarmet benzen, og ved udfældning heraf med 5 ml petroleumether og køling med isvand fik man 3,2 g prismes med smp. 104° ,5– 106° ,5, som viste benzofenon-ethylxanthogenhydrazonens sammensætning:

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHN : C(C_6H_5)_2 = C_{16}H_{16}ON_2S$ (284,37):

ber.:	C 67,57,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,27 %,
fund. (Ph):	» 67,31,	» 5,72,	» 9,93,	» 11,20 ».

3. Benzylxanthogenhydrazider og bezylxanthogenhydrazoner

A. Benzylxanthogenhydrazid

Ved neutralisation af 122 g efter K. J. LENANDER¹ fremstillet benzylxanthogenedikesyre med 250 ml 2-n natriumhydroksyd opstod en krystalgrød, til hvilken sættes 30 ml hydrazinhydrat. Herved opstod under svag varmeudvikling en klar opløsning, som dog snart emulgeredes og til næste dag udskildte 86,4 g krystalskål med smp. 60° – 61° ,5. Ved omkrystallisation af 82 g af dette råprodukt af 200 ml benzen fik man 62 g svagt rosa, silkeglinsende skål med smp. 60° – 62° . Heraf opløstes 1 g i 5 ml tør ether, filtreredes og efterlod i frivillig inddampning 0,95 g farveløse, smalle prismes (med samme smp.), som efter analysen bestod af rent benzylxanthogenhydrazid:

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHNH_2 = C_8H_{10}ON_2S$ (182,24):

ber.:	C 52,72,	H 5,53,	N 15,37,	S 17,59 %,
fund. (Ph):	» 52,86,	» 5,59,	» 15,41,	» 17,66 ».

Ved fremstilling af benzylxanthogenhydrazidet direkte af tilsvarende xanthogenat sættes til en af 34 ml benzylalkohol, 19,2 g kaliumhydroksyd i 120 ml vand og 20,4 ml svovlulstof efter LENANDER tilberedt xanthogenatopløsning 16 ml hydrazinhydrat, hvorved efter nogle minutter udkrystallisation indtrådte og til næste dag 37,5 g benzylxanthogenhydrazid med smp. 59° ,5– 61° ,5, også i blanding med det ovenfor beskrevne produkt, udskildtes.

Ved forsøg på at titrere 0,2233 g benzylxanthogenhydrazid i 20 ml 50 %-ig sprit mod fenoltalein indtrådte rosafarvning allerede efter tilsætning af 3 ml 0,1-n natriumhydroksyd, og ved tilsvarende forsøg med methylrødt som indikator opstod skarpt omslag allerede med første dråbe 0,1-n natriumhydroksyd.

Ved tilsætning af 20 ml 1-n saltsyre til 3,65 g benzylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og frivillig inddampning af den herved dannede klare opløsning, efterlod denne

¹ Disputats, Lund 1920.

4 g finkrystallinsk pulver, som under destruktion smeltede ved 107° – 108° og mod methylrødt viste äkvivalentvägt 217,4, ber. 218,7, men efter nogen tids opbevaring viste for lavt klorindhold.

Ved tilsætning af 5 ml 2-n svovlsyre til 1,8 g benzylxanthogenhydrazid i 10 ml sprit opstod en grød af flade, farveløse prismes, som efter afsugning, vaskning med vand og törring i luften vejede 1,75 g, smeltede under sönderdeling ved ca. 160° og mod methylrødt viste äkvivalentvägt 233,3 mod beregnet 231,3.

For $(C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHNH_3)_2 : SO_4 = C_{16}H_{22}O_6N_4S_3$ (462,55):

ber.: S 20,80 %; fund. (Ph): S 20,71 %.

Af 3,65 g benzylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og 1,9 ml *eddikesyreanhydrid* opstod under afköling af blandingen med rindende vand 3,2 g svagt rosa krystalpulver, som under destruktion smeltede ved 135° – 137° . Ved omkrystallisation af 1 g heraf af 50 ml benzen opstod 0,9 g prismes, der under destruktion smeltede ved 136° – 137° ,5. Ved titrering af 0,2506 g af disse i 30 ml 60 %-ig sprit mod fenolftalein opstod et svagt omslag med 10,85 ml 0,1002-n natriumhydroksyd, svarende til äkvivalentvägt 230,4 mod beregnet 224,3.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHNH \cdot CO \cdot CH_3 = C_{10}H_{12}O_2N_2S$ (224,27):

ber.: C 53,55, H 5,39 %; fund. (Ph): C 53,22, H 5,30 %.

B. 1-Ethylxanthogen-2-benzylxanthogenhydrazid

Til en med 20 ml 1-n natriumhydroksyd neutraliseret oplösning af 4,8 g benzylxanthogeneddikesyre i 20 ml sprit sattes en af 3,1 g ethylxanthogenhydrazidhydroklorid og 20 ml 1-n natriumhydroksyd fremstillet oplösning, hvorved en homogen blanding opstod. Denne udskilte til näste dag en farvelös oile, som i isskab blev til 4,3 g krystalmasse med smp. 84° – 86° og äkvivalentvägt 266,4 (mod fenolftalein). Ved udfäldning af 3,9 g af dette produkt af sin oplösning i 10 ml benzen med 5 ml petroleumether under podning med råproduktet udskiltes 3,0 g smalle prismes med smp. 87° – 88° og äkvivalentvägt som ovenfor 268,7 mod ber. 270,4.

For $C_2H_5O \cdot CS \cdot NHNH \cdot CS \cdot OCH_2C_6H_5 = C_{11}H_{14}O_2N_2S_2$ (270,36):

ber.:	C 48,86,	H 5,22,	N 10,36,	S 23,72 %.
fund. (Ph):	» 48,92,	» 5,32,	» 10,37,	» 23,39 ».

Samme hydrazid opstod, da man til en oplösning af 3,6 g ethylxanthogeneddikesyre i äkvivalent mængde 1-n natriumhydroksyd satte 3,65 g benzylxanthogenhydrazid i 20 ml sprit. Til näste dag udskiltes en oile, der efter podning med det ovenfor beskrevne produkt blev til 3,6 g krystalmasse med smp. 84° – 86° , efter omkrystallisation af 10 ml benzen 2,9 g med smp. 85° ,5– 88° og äkvivalentvägt (mod fenolftalein) 271,3, mod beregnet 270,4.

C. 1,2-Dibenzylxanthogenhydrazid

En oplösning af 75 g benzylxanthogeneddikesyre i 150 ml sprit neutraliseredes med 59 ml 5-n natriumhydroksyd. Hertil sattes 7,1 ml hydrazinhydrat. Efter 3 timer ved stuetemperatur begyndte smalle, prismatiske krystaller at udskilles. Efter at blandingen havde stået ved stuetemperatur et dögn og derpå lige så længe i isskab, fik man ved afsugning, vaskning med 70 %-ig sprit, 1-n saltsyre og vand samt

törring i luften 43 g silkeglinsende krystaller med smp. 117°, 5–119°. Ved omkrystallisation af 5 g af disse af 15 ml benzen fås 4 g prismatiske stave med smp. 118°–119°, 5 og äkvivalentvägt (mod fenoltalein) 331,8 mod beregn. 332,4.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHNH \cdot CS \cdot OCH_2C_6H_5 = C_{16}H_{16}O_2N_2S_2$ (332,42):

ber.:	C 57,81,	H 4,85,	N 8,43,	S 19,29 %,
fund. (Ph):	» 57,75,	» 4,89,	» 8,59,	» 19,25 ».

D. 1-Benzylxanthogen-2-benzoylhydrazid

Ved sammenblanding af 4 g benzoylthioglykolsyre, fremstillet efter B. HOLMBERG¹, i 10 ml 2-n natriumhydroksyd og 3,6 g benzylxanthogenhydrazid i 10 ml sprit opstod en klar opløsning, som næste dag efter podning med krystaller fra et forforsøg dannede grød af krystalnåle, efter afsugning, vaskning med 10 ml 50%-ig sprit og törring i luften 0,65 g med smp. 134°, 5–136°, hvilket ikke ændrede sig ved omkrystallisation af stoffet af benzen. Moderluden gav ved frivillig afdampning af spritten på 4 dage 3,6 g farveløs krystalblanding, som efter nogen forudgående sintring smeltede ved 104°–115°, og som ved omkrystallisation af 35 ml benzen gav yderligere 1,4 g nåle med smp. 134°, 5–136°. Ved titrering af 0,2538 g af disse i 30 ml sprit mod fenoltalein opstod et svagt omslag med 8,70 ml 0,1002-n natriumhydroksyd, svarende til äkvivalentvägt 291,1 mod beregnet 286,3, og ved analyse viste stoffet 1-benzylxanthogen-2-benzoylhydrazidets sammensætning:

For: $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHNH \cdot CO \cdot C_6H_5 = C_{15}H_{14}O_2N_2S$ (286,34):

ber.:	C 62,91,	H 4,93,	N 9,78 %,
fund. (Ph):	» 63,04,	» 4,90,	» 9,87 ».

Ved frivillig inddampning af benzenmoderluden fra omkrystallisationen fik man 2,1 g uforbrugt benzylxanthogenhydrazid med smp. 53°–58°, i blanding med rent benzylxanthogenhydrazid 56°–59°.

E. 1-Benzylxanthogen-2-fenylhydrazid

Af 12,1 g med 2-n kaliumhydroksyd neutraliseret benzylxanthogeneddikesyre og 5 ml fenylhydrazin i 50 ml vand opstod en homogen blanding, som snart emulgeredes og udskilte korte, skråt afskårne prismar. Efter afsugning næste dag, vaskning med vand og törring i luften vejede disse 11,7 g og smeltede ved 132°–134°. Ved omkrystallisation af 200 ml benzen gav 10 g af dette produkt 8,5 g nålformede krystaller med smp. 134°, 5–136°, 5.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHNHC_6H_5 = C_{14}H_{14}ON_2S$ (258,33):

ber.:	C 65,09,	H 5,46,	N 10,85 %,
fund. (Ph):	» 64,86,	» 5,34,	» 10,95 ».

F. Aldo-benzylxanthogenhydrazoner

Ved reaktion mellem benzylxanthogenhydrazidet og *formaldehyd* opstod klistrede produkter, som det ikke lykkedes at få til at krystallisere.

Ved tilsætning af 2,2 ml nydestilleret *acetaldehyd* til en opløsning af 7,3 g benzylxanthogenhydrazid i 30 ml sprit opstod en homogen blanding, som under svag

¹ B. HOLMBERG (1944) cit. side 1.

varmeudvikling snart begyndte at udskille smalle krystalprismer. Disse gav næste dag efter afsugning, vaskning med noget sprit og petroleumether og tørring i luften 6,0 g med smp. $112^{\circ},5-113^{\circ},5$. Ved omkrystallisation af 3 g af dette produkt af 10 ml sprit fremkom 1,8 g prismatiske krystalstave med uforandret smp.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : CHCH_3 = C_{10}H_{12}ON_2S$ (208,27):

ber.: C 57,67, H 5,81, N 13,45 %; fund. (Ph): C 57,27, H 5,60, N 13,65 %.

Ved sammenblanding af 5,4 g benzylxanthogenhydrazid i 10 ml sprit og 5 g *benzaldehyd* i samme mængde sprit opstod en svagt opalescent opløsning, som under moderat varmeudvikling blev gullig og efter podning med krystaller fra et forforsøg i løbet af 12 timer udskilte 7 g smalle, farveløse prismes med smp. $121^{\circ},5-123^{\circ},5$. Ved omkrystallisation af 5 g af dette produkt af 10 ml benzen fremkom 4,5 g prismes med smp. $124^{\circ}-125^{\circ},5$.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : CHC_6H_5 = C_{15}H_{14}ON_2S$ (270,34):

ber.: C 66,64, H 5,22, N 10,36, S 11,86 %,
fund. (Ph): » 66,72, » 5,25, » 10,64, » 11,86 %.

Da man til en opløsning af 3,65 g benzylxanthogenhydrazid i 10 ml sprit satte 2,4 g *salicylaldehyd* i 5 ml sprit opstod en svag varmeudvikling og udfældning af prismatiske krystaller. Efter afsugning næste dag, vaskning med sprit og tørring i luften vejede disse 5,5 g og smeltede under sønderdeling brat ved 173° . Ved omkrystallisation af 4 g af råproduktet af 125 ml benzen fik man 2,9 g nåle med uforandret smp.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : CHC_6H_4OH = C_{15}H_{14}O_2N_2S$ (286,34):

ber.: C 62,91, H 4,93, N 9,78 %,
fund. (Ph): » 62,48, » 4,73, » 9,78 %.

Da man til en opløsning af 3,65 g benzylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit satte 2,5 ml (2,8 g) *anisaldehyd*, opstod en temperaturstigning til ca. 45° og efter 15 minutters forløb begyndte hvide nåle at udskilles. Efter afsugning næste dag, vaskning med 5 ml sprit og 10 ml petroleumether samt tørring i luften vejede disse 5,7 g og smeltede ved $124^{\circ}-125^{\circ}$. Ved omkrystallisation af 1 g heraf af 5 ml benzen fik man 0,9 g nåle med smp. $124^{\circ},5-125^{\circ},5$.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : CHC_6H_4OCH_3 = C_{16}H_{16}O_2N_2S$ (300,36):

ber.: C 63,98, H 5,37, N 9,33, S 10,67 %,
fund. (Ph): » 64,13, » 5,30, » 9,44, » 10,53 %.

Af 3,64 g benzylxanthogenhydrazid i 10 ml sprit og 3,2 g *p-nitrobenzaldehyd* i samme spritmængde opstod straks en grød af korte, gule prismes, som næste dag efter afsugning, vaskning med 10 ml sprit og tørring i luften vejede 6,25 g og under destruktion smeltede skarpt ved en temperatur, afhængig af opvarmningshastigheden, mellem 160° og 166° . Ved omkrystallisation af 2 g af råproduktet af 30 ml benzen fik man 1 g prismes, som under identiske forhold viste samme smp. som råproduktet.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : CHC_6H_4NO_2 = C_{15}H_{13}O_3N_2S$ (315,34):

ber.: C 57,13, H 4,16, N 13,33 %,
fund. (Ph): » 57,33, » 4,05, » 13,44 %.

Ved rystning af en opløsning af 8,3 g nydestilleret *furfural* i 40 ml sprit med 18,2 g benzylxanthogenhydrazid opstod snart en homogen opløsning, som til næste dag udskilte rosetter af fine nåle. Efter 6 timers afkøling med isvand, afsugning, vaskning med 30 ml iskold sprit og tørring i luften vejede disse 24,3 g og smeltede ved 119°–121° under gulfarvning. Ved omkrystallisation af 5 g råprodukt af 20 ml benzen fik man 1,6 g mikroskopiske stave, som under gulfarvning smeltede ved 120°–121°,5.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : CHC_4H_3O = C_{13}H_{12}O_2N_2S$ (260,31):

ber.:	C 59,98,	H 4,65,	N 10,76 %,
fund. (Ph):	» 59,67,	» 4,64,	» 10,90 ».

G. Keto-benzylxanthogenhydrazoner

Da man til en opløsning af 3,6 g benzylxanthogenhydrazid i 15 ml sprit satte 1,5 ml *acetone*, opstod en klar opløsning, som til næste dag ikke ændredes, men derefter ved frivillig inddampning på 2 døgn udskilte 4,2 g nålformede prizmer med smp. 55°–63°. Ved omkrystallisation af 4 g heraf af 5 ml benzen fik man 2,6 g med 10 ml petroleumether vaskede og i luften tørrede prizmer med smp. 65°,5–68°.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)_2 = C_{11}H_{14}ON_2S$ (222,30):

ber.:	C 59,43,	H 6,35,	N 12,60,	S 14,42 %,
fund. (Ph):	» 59,23,	» 6,39,	» 12,85,	» 14,34 ».

Ved tilsætning af 2 ml *methylethylketon* til en opløsning af 3,64 g benzylxanthogenhydrazid i 10 ml sprit opstod en klar opløsning, som efter podning med krystaller fra et forforsøg på 12 timer ved stuetemperatur udskilte rosetter af smalle, skråt afskårne prismatiske krystalstave. Efter opbevaring ved –4° i 36 timer, afsugning, vaskning med 5 ml sprit af samme temperatur og med 10 ml petroleumether og tørring i luften vejede de 4,0 g og smeltede ved 69°–70°. Ved omkrystallisation af 1 g heraf af en blanding af 5 ml petroleumether og 2 ml benzen fik man 0,55 g med smp. som forud.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)C_2H_5 = C_{12}H_{16}ON_2S$ (236,32):

ber.:	C 60,98,	H 6,83,	N 11,86 %,
fund. (Ph):	» 61,03,	» 6,74,	» 11,80 ».

Af 3,64 g benzylxanthogenhydrazid i 10 ml sprit og 2,5 ml *acetylacetone* opstod en homogen, næste dag uforandret blanding, som derpå ved tilsætning af 10 ml vand udskilte en olie, der i isskab til næste dag gik over i en krystalkage. Efter afsugning, vaskning med 10 ml vand og tørring i luften fik man 4,9 g pulver med smp. 86°–88°. Dette gav ved omkrystallisation af 10 ml benzen 2,2 g krystalskål med smp. 85°,5–87°,5, og af moderluden herfra fik man efter tilsætning af 10 ml petroleumether yderligere 1,2 g krystaller med smp. 85°–88°. Det først udskilte produkt gav ved analyse:

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)CH_2COCH_3 = C_{13}H_{16}O_2N_2S$ (264,33):

ber.:	C 59,06,	H 6,10,	N 10,60,	S 12,13 %,
fund. (Ph):	» 59,46,	» 5,95,	» 10,61,	» 12,20 ».

På samme måde som ovenfor beskrevet, men med blot 1,0 ml *acetylacetone* fik man 3,4 g krystalliseret produkt med smp. 114°–122°. Ved fældning fra en opløs-

ning af dette i 15 ml benzen med 25 ml petroleumether opstod först en olie, som dog til næste dag gik over i 2,6 g mikroskopiske stavformede krystaller med smp. $126^{\circ},5$ $128^{\circ},5$ og acetylacetone-bis-benzylxanthogenhydrazonens sammensætning:

For $[C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)_2 : CH_2 = C_{21}H_{24}O_2N_4S_2$ (428,55):

ber.:	C 58,85,	H 5,65,	N 13,08 %,
fund. (Ph):	» 59,23,	» 5,67,	» 13,31 ».

Af 5,4 g benzylxanthogenhydrazid i 20 ml sprit og 2,7 g *pyrodruesyre* i 5 ml sprit opstod en homogen blanding, som under moderat varmeudvikling farvedes gulgrøn. Efter 12 timer ved stuetemperatur gav opløsningen med 25 ml vand en emulsion, som udskildte en gullig olie. Da en dråbe heraf blev revet med saltsyre, indtrådte krystallisation, og efter podning med den krystalliserede prøve krystalliserede også hovedportionen i prismatiske stave, som efter 6 timer blev afsuget, vasket med 50 %-ig sprit og tørret i luften til 6,9 g med äkvivalentvägt 260 (mod methylrødt) og som efter let sintring ved 129° smeltede ved 154° – 157° . Ved digerering på dampbad af 5,8 g af dette produkt med 50 ml benzen fik man, efter at den heterogene blanding havde stået ved stuetemperatur i 2 dage, ved afsugning, vaskning med 10 ml benzen og törring i luften 5,3 g pulver, som ved langsom ophedning smeltede ved 154° – 157° , men som ved brat ophedning smeltede ved $135^{\circ},5$ – $136^{\circ},5$ under destruktion, og som viste äkvivalentvägt 253,5 (mod methylrødt), ber. 252,3. Ved omkrystallisation af 1 g heraf af 25 ml benzen fik man 0,8 g mikroskopiske stave med smp. som för og med äkvivalentvägt 253,1 (mod methylrødt).

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)COOH = C_{11}H_{12}O_3N_2S$ (252,28):

ber.:	C 52,37,	H 4,79,	N 11,11 %;
fund. (Ph):	» 52,77,	» 4,72,	» 11,12 ».

Da man til en opløsning af 5,4 g benzylxanthogenhydrazid i 20 ml sprit satte 3,5 g *levulinsyre* i 5 ml vand, kom der en svag varmeudvikling, og en homogen, næste dag uforandret opløsning opstod. Ved frivillig afdampning af ethanolen udskildte blandingen farveløse rosetter af smalle prismer, som efter afsugning, vaskning med vand og törring i luften vejede 6,3 g, smeltede ved 115° – 116° og mod methylrødt med noget uskarpt omslag viste äkvivalentvägt 286. Ved omkrystallisation af 5 g af 35 ml benzen fik man 4,6 g smalle prismer med smp. 118° – 119° . Ved titrering af 0,2154 g heraf i 25 ml 70 %-ig sprit mod methylrødt fik man et noget uskarpt omslag med 7,60 ml 0,1001-n natriumhydroksyd, svarende til äkvivalentvägt 283,1, ber. 280,3. Da på samme måde 0,2112 g titreredes mod fenoltalein fik man et svagt omslag med 8,30 ml, svarende til äkvivalentvägt 254,2.

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)CH_2CH_2COOH = C_{13}H_{16}O_3N_2S$ (280,33):

ber.:	C 55,69,	H 5,75,	N 9,99 %,
fund. (Ph):	» 56,14,	» 5,81,	» 9,93 ».

Af 1,8 g benzylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og 1,0 g *cyclohexanon* i samme mængde sprit opstod en homogen blanding, som næste dag var uforandret og med 10 ml vand gav en emulsion, som udskilte en gullig olie. Efter at blandingen havde stået i isskab over natten, begyndte olien ved omrystning at stivne, og efter endnu et døgn havde der udskilt sig en krystalkage, som efter rivning med vand, afsugning, vaskning med mere vand og törring i luften gav 2,3 g pulver med smp. 72° – 75° . Dette produkt gav efter opløsning i 5 ml benzen ved udfældning med 15 ml petro-

leumether en mikrokrySTALLINSK masse, som, efter at blandingen havde stået i isskab til næste dag, ved rivning, afsugning, vaskning med petroleumether og tørring i luften gav 1,9 g pulver med smp. 77° – 78° .

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C_6H_{10} = C_{14}H_{18}ON_2S$ (262,36):

ber.:	C 64,09,	H 6,92,	N 10,68 %,
fund. (Ph):	» 64,27,	» 6,72,	» 10,78 ».

Af 3,6 g benzylxanthogenhydrazid i 15 ml sprit og 2,4 g *acetofenon* opstod en klar opløsning, som til næste dag udskilte farveløse, flade prismer, som efter afsugning, vaskning med sprit og tørring i luften vejede 1,3 g og smeltede ved $105^{\circ},5$ – $109^{\circ},5$. Moderluden uskilte i isskab til næste dag yderligere 0,7 g krystaller med samme smp. Filtratet herfra gav med 20 ml vand en emulsion, som i isskab gav 2 g uforbrugt hydrazid med smp. 53° – 56° . — Af det fremkomne produkt med smp. $105^{\circ},5$ – $109^{\circ},5$ omkrystalliseredes 2 g af 5 ml benzen og gav 1,5 g krystalskål med smp. $107^{\circ},5$ – $109^{\circ},5$ og acetofenon-benzylxanthogenhydrazonens sammensætning:

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)C_6H_5 = C_{16}H_{16}ON_2S$ (284,36):

ber.:	C 67,58,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,27 %,
fund. (Ph):	» 67,85,	» 5,63,	» 9,98,	» 11,54 ».

Ved tilsætning af 27,3 g *fenylacetone* til en varm opløsning af 18,2 g benzylxanthogenhydrazid i 40 ml sprit udskilte den homogene opløsning til næste dag ved stuetemperatur smalle prismer, hvis mængde forøgedes ved 6 timers opbevaring af blandingen i isskab. Efter afsugning, vaskning med 40 ml iskold sprit og lufttørring vejede produktet 21,7 g og smeltede ved 82° – 84° . Efter udfældning med petroleumether af benzenopløsning som prismatiske nåle viste stoffet samme smp. og ved analyse gav det:

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)CH_2C_6H_5 = C_{17}H_{18}ON_2S$ (298,40):

ber.:	C 68,42,	H 6,08,	N 9,39,	S 10,75 %,
fund. (Ph):	» 68,10,	» 6,14,	» 9,41,	» 10,73 ».

Filtratet fra råproduktet udskilte efter tilsætning af 80 ml vand i isskab yderligere 2,5 g hydrazon med smp. 81° – 84° .

Af 3,65 g benzylxanthogenhydrazid i 5 ml sprit og 3,3 g *anisylacetone* opstod en klar opløsning, som ikke forandredes på et døgn ved stuetemperatur, men derpå i isskab til næste dag udskilte en kage af korte, farveløse prismer, som efter afsugning, vaskning med 5 ml sprit og tørring i luften vejede 6,2 g og smeltede ved 89° – $90^{\circ},5$. En opløsning af 2 g af dette produkt i 10 ml benzen forblev homogen efter tilsætning af 15 ml petroleumether, men udskilte derefter i køleskab til næste dag 1,5 g prismer med smp. 89° – 91° .

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(CH_3)CH_2C_6H_4OCH_3 = C_{18}H_{20}O_2N_2S$ (328,42):

ber.:	C 65,83,	H 6,14,	N 8,53 %,
fund. (Ph):	» 65,77,	» 6,06,	» 8,75 ».

Da man til en opløsning af 18,4 g benzylxanthogenhydrazid i 40 ml varm sprit satte en ligeledes varm opløsning af 10,5 g *benzil* i 50 ml sprit opstod en klar, gul opløsning, som ved afsvaling gik over i en gul grød af prismatiske krystaller. Efter 3 døgn ved stuetemperatur, afsugning, vaskning med 20 ml sprit og 90 ml petro-

leumether og törring i luften fik man 12,3 g gullige, smalle prismen som efter nogen sintring og stærk gulfarvning smeltede ved 124° – 126° . Ved opløsning af råproduktet i 30 ml benzen, tilsætning af 30 ml petroleumether og podning med råproduktet fik man efter at blandingen havde stået i isskab til næste dag 10,2 g lidt gullige prismen, der efter nogen sintring og kraftig gulfarvning smeltede ved 126° – 127° , og som bestod af benzilens mono-benzylxanthogenhydrazon:

For $C_6H_5CH_2O \cdot CS \cdot NHN : C(C_6H_5)COC_6H_5 = C_{22}H_{18}O_2N_2S$ (374,44):

ber.:	C 70,56,	H 4,85,	N 7,48,	S 8,56 %,
fund. (Ph):	» 70,70,	» 4,91,	» 7,55,	» 8,52 ».

Alkoholfiltratet fra råproduktet udskilte efter tilsætning af 50 ml vand og afkøling i isvand i 3 timer 9,5 g uforbrugt benzylxanthogenhydrazid med smp. 50° – 53° , efter udfældning af sin opløsning i benzen med petroleumether med smp. 59° – 61° , såvel for sig selv som i blanding med ren benzylxanthogenhydrazid.

SUMMARY

By treating xanthogenacetic acids and xanthogenates with hydrazine and phenylhydrazine the following xanthogenhydrazides have been obtained: ethylxanthogenhydrazide, benzylxanthogenhydrazide, 1,2-diethyl- and 1,2-dibenzylxanthogenhydrazides, 1-ethylxanthogen-2-benzylxanthogenhydrazide, 1-ethylxanthogen-2-phenylhydrazide and 1-benzylxanthogen-2-phenylhydrazide.

Treatment of ethyl- and benzylxanthogenhydrazide with benzoylthioglycolic acid resulted in 1-ethylxanthogen-2-benzoylhydrazide resp. 1-benzylxanthogen-2-benzoylhydrazide, but when ethylxanthogenhydrazide was treated with thio-benzoylthioglycolic acid, the primary product 1-ethylxanthogen-2-thiobenzoylhydrazide spontaneously lost hydrogen sulfide and formed 2-ethoxy-5-phenyl-1,3,4-thiodiazole.

The ethylxanthogenhydrazones and benzylxanthogenhydrazones of a number of aldehydes and ketones have been prepared.

Tryckt den 22 november 1949

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Studien über die intrazelluläre Verteilung der Enzyme

III. Die intrazelluläre Verteilung der Monobutyrase in der Leber normaler und sarkomatöser Ratten

VON LEO HELLER und NORA BARGONI¹

Die vorliegende Mitteilung bildet die Fortsetzung einer Reihe von Untersuchungen, die sich mit der Frage der intrazellulären Verteilung verschiedener Fermentsysteme in der Leber normaler und übergeimpfte Sarkome tragender Ratten befassen. Während die beiden früheren Mitteilungen aus diesem Laboratorium über die intrazelluläre Verteilung der Katalase-(1) resp. Histidase-(2) Aktivitäten berichteten, wollen wir im folgenden die Resultate einiger Versuche einer Bestimmung der Verteilung der esterspaltenden Aktivität der butyrischen Monoesterase zwischen verschiedene Fraktionen der Rattenleberzelle beschreiben.

Die Bedeutung einer genauen Kenntnis der 'intrazellulären Topographie' (1, 3) der einzelnen Enzymsysteme für das Verstehen der ganzen Kinetik des Zellgeschehens ist so einleuchtend, dass sie kaum einer Beweisführung bedarf. Wenn ein intrazelluläres Enzym hauptsächlich an eine Art der morphologisch unterscheidbaren Zellbestandteile gebunden vorkommt, dann muss es in einer engen funktionellen Beziehung mit der Art der physiologischen Funktionen stehen, die seinem Träger, d. h. dem entsprechenden Bestandteile der Zelle (wie das Zellkern, die Mitochondrien, das Nukleolus etc.) im komplexen Gesamtvorgange des Zellebens angewiesen sind.

Die uns zur Verfügung stehenden Methoden der Lokalisierung und quantitativer Messung der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Zellkomponenten (für eine kurze Übersicht dieser Methoden vgl. (2)) sind immer noch ziemlich grob und unvollkommen. Sie sind entweder histochemischer Natur, wie etwa die Phosphatase- u. Lipase-Methoden von GOMORI (4), oder auch vergleichen sie die Enzymaktivitäten der isolierten morphologischen Zellbestandteile, wobei eine äusserst schonende Darstellung dieser Elemente in einem möglichst reinem Zustande für die Zuverlässigkeit der aus den Ergebnissen der nachträglichen Aktivitätsbestimmung gezogenen Schlüsse von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Wir sind immer noch darauf angewiesen, aus einem Vergleiche zweier Enzymaktivitäten auf die relativen Enzym-Konzentrationen resp. -Mengen schliessen zu müssen, da eine direkte Bestimmung der Enzymmenge (besonders des eiweissartigen Apoenzyms) in den allermeisten Fällen nicht möglich ist. Da aber die einzig direkt bestimmbaren Enzymaktivitäten im allgemeinen von einer Anzahl äusserer Faktoren abhängig sind und somit keinen unbedingt richtigen

¹ Fellow Intern. Fed. of University of Woman.

Masstab der absoluten vorhandenen Enzymmenge bilden, können wir den Ergebnissen, die durch das Schliessen aus der Enzymaktivität auf die Enzymmenge erzeugt wurden, eine nur bedingte Gültigkeit zuschreiben. In jedem konkreten Falle muss die Gültigkeit eines solchen Schlusses aufs gründlichste untersucht werden, bevor man sich berechtigt fühlen darf von einer intrazellulären Verteilung eines Enzyms zu sprechen, welche den Anspruch erheben kann den reellen Verhältnissen einer lebenden Zelle auch nur einigermaßen zu entsprechen. Bei derartigen vergleichenden Aktivitätsmessungen muss die Bestimmung der Enzymaktivitäten der einzelnen Zellbestandteile bei immer genau festgesetzten und konstantgehaltenen Bedingungen erfolgen, die für alle zu vergleichenden Zellfraktionen völlig identisch sind. Bei den meisten existierenden histochemischen Enzymmethoden pflegt diese Bedingung kaum erfüllt zu sein, und sie dürfen aus diesem Grunde im besten Falle als nur halbquantitativ bezeichnet werden. Dagegen besitzen sie den grossen Vorteil, dass sie die Wirkung der entsprechenden Enzyme 'in situ' anzeigen, obwohl auch bei den meisten von ihnen eine Vorbehandlung des Materials (etwa durch Fixierung) notwendig ist, welche die Enzymaktivität mehr oder weniger stark beeinträchtigen kann.

Bei der anderen Gruppe von Methoden, welche die Aktivität der isolierten Zellbestandteile messen, ist es natürlich viel leichter für die Konstanz und optimale Beschaffenheit des Reaktionsmilieus bei der Messung der Enzymaktivität jeder der zu vergleichender Fraktionen zu sorgen. Die Hauptschwierigkeiten liegen hier bei der Zellfraktionierung, die so geführt werden muss, dass grössere, und vor allem ungleichmässige Verluste an Enzymsubstanz oder -Aktivität während der Fraktionierung des Materials und der Reinigung der einzelnen Fraktionen unbedingt vermieden werden. Ob das im einzelnen Falle gelungen ist, kann wohl am leichtesten durch einen Vergleich der Summe der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen mit der Aktivität des frischen, unbehandelten Materials geprüft werden. Aber auch wenn dabei eine gute Übereinstimmung gefunden wird, bleibt immer noch die Möglichkeit etwaiger Enzymverschiebungen während der Fraktionierung oder auch die sich gegenseitig aufhebenden Aktivationen und Hemmungen der einzelnen Fraktionen offen. Dieser Vorbehalte muss man sich bewusst sein bei der Beurteilung der Ergebnisse derartiger Enzymverteilungsstudien.

Wenn man nun die zurzeit verfügbaren Daten über die intrazelluläre Verteilung verschiedener Enzymsysteme analysiert, so ergibt sich, dass wir dabei mehrere Typen der Enzymsysteme unterscheiden können. (Für eine Übersicht vgl. (5), für die Hefezellen — (6)). Ein Teil von ihnen scheint in der Zelle ziemlich gleichmässig verteilt zu sein, d. h. ungefähr die gleiche Aktivität in jeder der Zellfraktionen zu zeigen, freilich oft mit der Ausnahme des Zellkerns (5), dessen enzymatische Ausrüstung ziemlich dürftig sein muss, wenigstens in Hinsicht auf die zurzeit bekannten Enzymsysteme (die Zellkerne scheinen z. B. praktisch katalasefrei zu sein (7, 1)). Zu dieser Gruppe gehören die meisten Hydrolasen, z. B. die beiden Phosphatasen, Amylase, Trypsin u. Kathepsin, Dipeptidase, Arginase u. Ribonuklease, die sowohl in den partikulären Elementen des Zytoplasmas wie auch in der interpartikulären Flüssigkeit in annähernd gleichen Konzentrationen aufgefunden worden sind. (Für eine Übersicht des Enzymgehaltes isolierter Zellkerne vgl. (7)). Andere Enzymsysteme wieder sind nur in gewissen einzelnen Fraktionen der Zelle aufgefunden worden: vor allem die oxydoreduktiven Systeme (Succinodehydrase, Zytochromoxydase, Fettsäure-

oxydase etc.) sind allem Anschein nach mit der Fraktion der grossen zytoplasmatischen Teilchen (Mitochondrien) gebunden (8, 9, 10).

Die vorliegende Arbeit ist der Frage der intrazellularen Verteilung eines weiteren Fermentsystems gewidmet, nämlich der butyrischen Monoesterase. Die Frage der Breite der Substratspezifität des für die Spaltung der Buttersäureester der einwertigen Alkohole verantwortlichen Enzymsystems spielt in diesem Zusammenhange keine Rolle — es wurde nur die Verteilung derjenigen Aktivität des Lebermonoesterasesystems untersucht, die sich in der enzymatischen Spaltung des Methylbutyrates äussert. Die Leberesterase, die im Gegensatz zu den früher in diesem Laboratorium untersuchten Enzymen (Katalase, Histidase — (1), (2)) zu den Hydrolasen gehört, ist ein relativ stabiles Enzym, dessen Aktivität in richtig bereiteten Extrakten eine längere Zeit ziemlich konstant bleibt und ausser vielleicht etwaiger Spuren von Mg^{++} -Ionen keiner Zusätze etwaiger Aktivatoren oder Koenzyme bedarf. Diese Eigenschaften erleichtern die Durchführung quantitativer Aktivitätsverteilungsstudien mittels differentieller Zentrifugation oder etwaiger anderer Fraktionierungsmethoden recht wesentlich. Gleichzeitig ist auch die Methodik der Aktivitätsbestimmung im Falle der Leberesterase eine relativ einfache und (bei gewissenhafter Ausführung) zuverlässige. Aus diesen allen Gründen haben wir dieses Enzymsystem als Gegenstand unserer weiterer Studien über die intrazelluläre Verteilung der Enzyme gewählt.

Experimentelles

Was die Technik der Leberfraktionierung anbelangt, so wurde in dem vorliegenden Falle die Methode der differentiellen Zentrifugation der Rattenleberhomogenate verwendet, die in einer der schon erwähnten früheren Arbeiten aus diesem Laboratorium (2) genau beschrieben worden ist. Diese Methode entspricht im Prinzip dem von HOGBOOM, SCHNEIDER u. PALLADE (11) angegebenen Verfahren, in welchem die von BENSLEY u. Mitarb. (12) ausgearbeitete und von CLAUDE (13) weiter entwickelte Methode der gegenseitigen Trennung morphologisch unterscheidbaren Zellbestandteile mittels wiederholter Zentrifugierung bei verschiedenen Geschwindigkeiten durch die Ausführung der Fraktionierung in hypertonscher Zuckerlösung weiter verbessert worden ist. Um die für quantitative Enzymaktivitätsstudien notwendige Konstanz der Wasserstoffionenkonzentration einzelnen Fraktionen zu sichern, haben wir die 30-prozentige Rohrzuckerlösung von HOGBOOM u. a. durch Zusatz von 0,01-molarem Phosphat auf ein pH von etwa 7,3 gepuffert (vgl. (2) u. (13)). Die Ausfällung der Mikrosomen wurde auch diesmal auf chemischem Wege durch Zusatz von Streptomycin erreicht (2,14).

Für die Bestimmung der butyrischen Monoesteraseaktivität einzelner Fraktionen haben wir die seinerzeit in diesem Institute ausgearbeitete Methode der Laugetitration der entstehenden freien Buttersäure bei konstantem pH (15) benutzt. Parallelbestimmungen, durchgeführt an einigen Leberfraktionen, ergaben im allgemeinen eine Übereinstimmung innerhalb einiger Prozente der gemessene Aktivitäten, die als Anzahl ml der verbrauchten 0,045-normalen Natriumlauge per Stunde ausgedrückt wurden. (Vgl. Tabellen).

Die Resultate der von uns durchgeführten Bestimmungen sind in den beigefügten Tabellen zusammengefasst, wobei die Aktivitäten einerseits per mg Stickstoff, andererseits per gm frische Lebersubstanz berechnet worden sind.

Der Stickstoffgehalt wurde mit der mikro-Kjeldahl-Methode nach der Vorschrift von Pregl bestimmt. Die Bezeichnungen der einzelnen Fraktionen mit Buchstaben sind dieselben wie in der Histidasearbeit (2). (H) bedeutet das Totalhomogenat, (E) — das zytoplasmatische Rohextrakt nach der Abzentrifugierung der Zellkerne durch zweimalige kurzdauernde (10 Minuten) Zentrifugation bei niedriger Tourenzahl (etwa 2000/Min.) in einer kleinen 'Wifug'-Winkelzentrifuge (2), (N) — die dabei erhaltene Zellkernfraktion, gereinigt durch zweimalige Umzentrifugierung (vgl. 2), (M) — die Mitochondrien, dessen fast quantitative Sedimentierung durch eine 1-stündige Zentrifugation bei etwa 10 000 per Minute in einer schneller laufenden Winkelzentrifuge ('Wifug' Typ) erreicht wurde, und (S) — das mitochondrienfreie, aber mikrosomenhaltige Zentrifugat nach zweimaliger Zentrifugation der letztbeschriebenen Art.

Wie schon erwähnt, wurde die letzte Etappe der Fraktionierung, nämlich die Ausfällung der Mikrosomen, auf chemischem Wege erreicht, nämlich mittels Streptomycin (2,14). Die entsprechenden Teilfraktionen von (S) wurden entsprechend als (F) (= Fällung) und (S_{str}) (Streptomycinzentrifugat) bezeichnet. Die Sedimentfraktionen (N, M und F) wurden in jedem Versuche in einer genau abgemessenen Menge der phosphatgepufferten 30-%-iger Zuckerlösung aufgeschwemmt, die ungefähr der Hälfte des jeweiligen Ausgangsextraktes entsprach.

Während die in den Tabellen angegebenen Esteraseaktivitäten per mg Stickstoff direkt, d. h. durch gleichzeitige Bestimmung der Enzymaktivität und des N-Gehaltes jeder Fraktion, erhalten worden sind, haben wir bei der Berechnung der Aktivitäten per Gramm Rattenleber nicht die individuellen Stickstoffwerte jeder Fraktion per Gramm frische Leber, wie sie in jedem einzelnen Versuche durch Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors ermittelt werden konnten, sondern die aus den korrigierten Werten aller bisheriger Leberfraktionierungsversuche berechneten Mittelwerte verwendet. (Für die Art der Berechnung der korrigierten Stickstoffwerte der einzelnen Fraktionen, Schätzung des Homogenisierungsgrades etc. — vgl. (1) und (2)). Dieses Verfahren beruht auf der Annahme einer ungefähren Konstanz der Zusammensetzung der Leberzelle aus ihren morphologischen Fraktionen wie auch einer Konstanz der diesen Fraktionen entsprechenden N-Werte. Die gute Übereinstimmung der N-Werte per Gramm Ausgangsmaterial, die wir bei denjenigen unserer Fraktionierungsversuche gefunden haben, wo die Versuchsfehler auf Grund der augenscheinlich erfolgreichsten Homogenisierung und mikroskopisch kontrollierbaren Genauigkeit der Trennung einzelner Zellelemente als weitgehend minimalisiert angesehen werden konnten, wie auch ihre Übereinstimmung mit den neuerlich von SCHNEIDER (16) bei der Benutzung ähnlicher Technik erhaltenen Durchschnittswerten, scheinen die Zulässigkeit einer solchen Annahme zu rechtfertigen. Die Anwendung derartiger Durchschnittswerte für die Stickstoffzahlen einzelner Leberfraktionen (deren Summe dem Stickstoffgehalte des Totalhomogenates selbstverständlich entsprechen muss) hat gegenüber der Anwendung analoger aber individuell aus den Versuchsdaten jeden Versuches ermittelten N-Zahlen per Gramm Lebersubstanz den Vorteil einer weitgehenden Eliminierung unvermeidlicher Versuchsfehler, die mit dem aus mehreren Etappen zusammengesetzten Fraktionierungsprozess verbunden sind. Tabelle I gibt die auf der Basis der durchschnittlichen resp. der für das gegebene Versuch individuell gefundenen Stickstoffwerte per Gramm Leber berechneten Esteraseaktivitäten der einzelnen Versuche an, während in der Tabelle 2 die aus allen Versuchen errechneten Durchschnittsaktivitäten angegeben sind.

Insgesamt wurden 4 Versuche mit Normalratten (bezeichnet mit der Buchstabe n) und zwei mit Sarkomratten (s) durchgeführt. Im Versuche 1 n wurden die Leber zweier Ratten (etwa 5 Monate alte Tiere) und im Versuche 2 n eine grössere Anzahl von Lebern junger, etwa 2 Wochen alter Ratten verarbeitet. In den übrigen 4 Versuchen wurde jedesmal nur eine Rattenleber fraktioniert, wobei das Alter der verwendeten Tiere zwischen etwa 4 und 6 Monaten betrug. Im Versuche 3 s wurde eine Benzpyrenratte verwendet (übergeimpftes Benzpyrentumor), im Versuche 4 s eine Jensensarkomratte. Das Gewicht der Tumoren betrug resp. 9, 4 und 8 Prozent des Körpergewichtes der Tiere (128 resp. 174 Gramm netto).

Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist bei der gefundenen grossen Schwankungen der gemessenen Esteraseaktivitäten (Tabelle 2) zu klein um etwaige feinere Unterschiede in der intrazellulären Verteilung dieses Enzyms zwischen gesunden und Sarkome tragenden Ratten zu erfassen. Die für die beiden Sarkomratten gefundenen Werte scheinen jedoch innerhalb der normalen Variationsgrenzen zu liegen. Aus diesem Grunde haben wir alle gefundenen Aktivitäten — sowohl der gesunden wie der Sarkomtiere — für die Berechnung von Durchschnittsaktivitäten verwendet, die in der Tabelle 2 zusammengefasst wurden. Aus dieser Tabelle können wir folgende Tatsachen mit einiger Sicherheit ablesen:

1) Die Zellkerne scheinen ziemlich arm an Monobutyrase zu sein, was sowohl durch die niedrigen Aktivitäten der Zellkernfraktionen (N) per mg Stickstoff, wie auch durch das Ausbleiben einer bedeutenden Aktivitätserniedrigung nach ihrer Abzentrifugierung angezeigt wird. Die durchschnittliche Aktivität per mg N ist sogar für das zytoplasmatische Totalextrakt (E) höher wie für das kernhaltige Totalhomogenat (H). Bei mehrmaligem Waschen der Zellkerne, bei welchem eine relativ vollständige Abtrennung der an den Zellkernen haftenden teilweise agglutinierten Mitochondrien erreicht wird (Fraktion N_b im Versuche 3s) verschwindet die Aktivität praktisch vollständig. Das schon erwähnte Ausbleiben einer Aktivitätserniedrigung bei der Darstellung von (E) aus (H) spricht gegen eine Deutung dieses Befundes im Sinne eines Auswaschens des Enzyms (oder eines unbekannten Aktivators) beim wiederholten Umzentrifugieren der Zellkerne.

Diese von uns gefundene anscheinende Armut der Zellkerne an Butyrase widerspricht den älteren Befunden von DOUNCE (17), der für die Zellkerne eine ganz ansehnliche Monoesteraseaktivität (etwa die halbe Aktivität des totalen Lebergewebes, auf Trockengewichtsbasis gerechnet) mittels einer halbquantitativer Technik gefunden hat. Ob dieser Widerspruch auf einer Infizierung der DOUNCE'schen Zellkerne mit den esterasehaltigen Mitochondrien oder auf einer Ungeeignetheit der hypertonen Zuckerlösung für die Erhaltung der natürlichen Monoesteraseaktivität der in ihr isolierter Zellkerne beruht, muss einer sorgfältigen Nachprüfung überlassen werden.

2) Wenn man von den Zellkernen absieht, so scheint die Butyrase, wie übrigens auch die meisten bisher untersuchten Hydrolasen (5, 6), ungefähr gleichmässig zwischen den einzelnen Fraktionen des Zytoplasmas verteilt zu sein, wenn man die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen (auf der Stickstoffbasis berechnet) miteinander vergleicht. Dieses Enzym scheint allen Bestandteilen der Rattenleberzelle eigen zu sein (vielleicht mit der Ausnahme von Zellkernen). Dementsprechend muss auch seine physiologische Funktion eine relativ unspezialisierte und für alle Bestandteile des Zytoplasmas notwendige sein.

Tabelle 1.

Monoesteraseaktivitäten der Leberfraktionen in den einzelnen Versuchen.

Ver- such	Fraktion	N-Gehalt per gm Leber		Enzymaktivität				
		individ. Versuchs- werte	Durch- schnittswerte aus allen Versuchen	per mg N	per Gramm Lebergewebe			
					aus den individuellen N-Werten		aus den durch- schnittlichen N-Werten	
					in ml. 0,045-m NaOH/St.	in ml. 0,045-m NaOH/St.	in %	in ml 0,045-m NaOH/St.
		mg	mg				in %	in %
1n	N	—	3,5	2,17	—	—	7,6	—
	M	—	6,9	2,39	—	—	16,5	—
	S	18,5	18,5	4,94	91,4	—	91,4	—
2n	H	26,0	28,9	3,02	78,5	(100)	87,2	(100)
	N	1,0	3,5	1,35	1,32	1,7	4,7	5,4
	M	5,05	6,9	2,06	10,4	13,3	14,2	16,3
	S	19,6	18,5	3,12	61,1	77,9	57,7	66,2
	F	—	—	—	17,8	22,7	16,8	19,3
	Sstr	—	—	—	28,5	36,4	27,0	31,0
	N+M+F+Sstr	—	—	—	58,0	74,1	62,7	72,0
5n	N+M+S	—	—	—	72,8	92,9	76,6	87,9
	H	21,2	28,9	3,48	73,8	(100)	100,6	(100)
	N	2,55	3,5	0,41	1,05	1,4	1,4	1,4
	M	1,21	6,9	2,43	2,9	3,9	16,8	16,7
	S	11,2	18,5	3,20	35,9	48,7	59,2	58,8
	F	—	—	—	8,3	11,4	13,7	13,6
	Sstr	—	—	—	17,5	23,7	28,9	28,7
	N+M+F+Sstr	—	—	—	29,75	40,3	60,8	60,5
	N+M+S	—	—	—	39,85	53,9	77,4	87,0
	H	25,2	28,9	5,02(?)	126,3(?)	(100)	144,8(?)	(100)
6n	E	18,7	25,4	4,94	92,4	73,2	125,3	86,7
	N	1,5	3,5	0,81	1,22	1,0	2,8	1,9
	M	2,6	6,9	3,50	9,2	7,3	24,2	16,7
	S	16,6	18,5	4,40	73,0	57,8	81,5	56,4
	F	—	—	—	16,8	13,3	18,8	13,0
	Sstr	—	—	—	44,0	34,8	49,2	34,0
	N+M+F+Sstr	—	—	—	71,2	56,4	95,0	65,7
	N+M+S	—	—	—	83,4	66,0	108,56	75,0
	H	26,2	28,6	verunglückt				
	E	22,9	25,1	3,88	88,8	—	97,3	—
3s	N	1,42	3,5	1,40	2,0	—	4,9	—
	Nb ²	1,40	3,5	0,12 ¹	± 0,2 ²	—	± 0,4 ²	—
	M	3,4	7,5	1,76	6,0	—	12,2	—
	S	—	17,6	4,06 ²	—	—	71,6 ¹	—
	F	—	—	—	19,5	—	21,4	—
	Sstr	—	—	—	62,8	—	68,8	—
	N+M+F+Sstr	—	—	—	90,3	—	107,3	—
	N+M+S	—	—	—	—	—	88,7 ¹	—
	H	26,4	28,6	3,12	82,4	(100)	89,2	(100)
	E	18,2	25,1	3,80	69,2	84,1	95,4	107,0
4s	N	2,05	3,5	1,62	3,3	4,0	5,7	6,4
	M	1,9	7,5	3,68	6,8	8,3	25,4	28,5
	S	13,3	17,6	4,28	56,9	69,2	75,3	84,5
	F	—	—	—	22,3	27,1	29,5	33,1
	Sstr	—	—	—	36,4	44,2	48,2	54,1
	N+M+F+Sstr	—	—	—	68,8	83,6	108,8	122,0
	N+M+S	—	—	—	67,0	81,4	106,4	119,3
	H	—	—	—	—	—	—	—
	E	—	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—	—

¹ unsicher² insgesamt 4-mal gewaschene Zellkerne

Tabelle 2.

Durchschnittliche Monoesteraseaktivitäten der Rattenleberfraktionen.

Fraktion	Enzymaktivität per mg N	Enzymaktivität per Gramm Lebergewebe:					
		ber. aus den individuellen N-Werten			ber. aus den durchschn. Stickstoffwerten		ber. aus den N-Werten von SCHNEIDER (16)
		ml 0,045-m NaOH/St.	ml 0,045-m NaOH/St.	%	ml 0,045-m NaOH/St.	%	ml 0,045-m NaOH/St.
H	3,66 (3,02-5,02)	90,2 (73,8-126,3)	(100)	105,4 (87,2-144,8)	(100)	111	(100)
E	4,21 (3,80-4,94)	83,5 (69,2-92,4)	92,7	106,0 (95,4-125,3)	100,5	111	100
N	1,3(?) (0,41-2,17)	1,8 (1,05-3,3)	2,0	4,5 (1,4-5,7)	4,3	5,2	4,7
M	2,64 (2,06-3,68)	7,1 (2,9-10,4)	7,9	18,2 (12,2-25,4)	17,3	21,4	19,3
S	3,99 (3,12-4,94)	64,8 (35,9-91,4)	71,9	73,0 (57,7-91,4)	69,3	72,4	65,3
F	3,52 ¹	16,9 (8,3-22,3)	18,8	20,0 (13,7-29,5)	19,0	19,6	17,7
Sstr	3,56 ¹	37,8 (17,5-62,8)	41,9	44,4 (27,0-68,8)	42,1	44,8	40,4
N+M+F+Sstr		63,6	70,6	87,1	82,7	91,0	82,1
N+M+S		73,7	81,8	95,7	90,9	99,0	89,3

¹ Aus den entsprechenden Stickstoff-Werten von SCHNEIDER (16) berechnet.

3) Die etwas niedrigere durchschnittliche Aktivität der Mitochondrienfraktion (per mg N gerechnet) scheint eine Ausnahme von der von BRACHET (6) angegebenen Regel zu bilden, nach welcher alle Hydrolasen in den zytoplasmatischen Granülen in einer höheren Konzentration vorzukommen pflegen, wie in der interpartikulären Zellflüssigkeit. Erstens scheinen aber die BRACHET'schen Beobachtungen hauptsächlich an den Hefezellen gemacht zu sein, und zweitens sind die von uns beobachteten Unterschiede der Mittelwerte mit einer so hohen Variation der Einzelwerte behaftet, dass der eben erwähnte Unterschied auf dem Grunde des vorliegenden Materials keineswegs als statistisch signifikativ betrachtet werden darf.

Stockholm, Universität, Institut f. organ.-chem. Forschung und Vitamin-Institut.

LITERATUR. (1) H. V. Euler u. L. Heller: Ztschr. f. Krebsforsch. 56, 393 (1949). — (2) H. v. Euler u. L. Heller: Dieses Arkiv 1, 37 (1949). — (3) E. D. P. de Robertis, W. W. Nowinski u. A. Saez: General Cytology (Philadelphia 1948). — (4) G. Gomori: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42: 23 (1939); 58: 362 (1945). — (5) J. N. Davidson: Cytochemistry (in Ann. Repts. of the Brit. Chem. Soc., 1945). — (6) J. Brachet: Soc. Exp. Biol. Symposia No 1 — 1947, S. 213. — (7) A. L. Dounce: Enzyme Systems of Isol. Cell Nuclei (Ann. N. Y. Acad. of Sc. 1948). — (8) G. H. Hogeboom, A. Claude u. R. D. Hotchkiss:

J. Biol. Chem. 165: 615 (1946). — (9) **W. C. Schneider**: J. Biol. Chem. 165: 585 (1947). — (10) **E. P. Kennedy** u. **A. L. Lehninger**: J. Biol. Chem. 172: 847 (1948). — (11) **G. H. Hogeboom**, **W. C. Schneider** u. **G. E. Pallade**: J. Biol. Chem. 172: 619 (1947). — (12) **R. R. Bensley** u. **N. L. Hoerr**: Anat. Records, 60: 449 (1934); **R. R. Bensley**: Science 96: 1 u. 389 (1942); **R. R. Bensley** u. **Mitarb.**: Bioch. Symposia, Bd. X (1943). — (13) **A. Claude**: Cold Spring Harb. Symp. 9: 263 (1941); Science 87: 467 (1938); 90: 213 (1939); 97: 451 (1943); Biol. Symp., Bd. X: 111 (1943); J. Exp. Med. 84: 51 u. 61 (1946). — (14) **H. v. Euler** u. **L. Heller**: Arkiv f. Kemi, Miner. o. Geol., Bd. 26 A, N:o 10. — (15) **Knaffl-Lenz**: Arch. exp. Path. 97, 242 (1923). — (16) **W. C. Schneider**: J. Biol. Chem. 176: 259 (1948). — (17) **A. L. Dounce**: J. Biol. Chem. 147: 685 (1943).

Tryckt den 19 december 1949.

Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

The optical antipodes of β -oxy- β -phenylpivalic acid and its methyl ester

By MAGNUS MATELL

With 4 figures in the text

In connection with investigation in progress at this institute into configurative relations, it was desirable to study the optical antipodes of β -oxy- β -phenylpivalic acid. (I)



This acid was resolved into optical antipodes, which to my know edge have not been described in the literature. The active acid had a notably small rotating power, less than 10° . It melted at 158° , while the melting point of the inactive acid was 134° . The melting point curve of the antipodes (fig. 1) shows

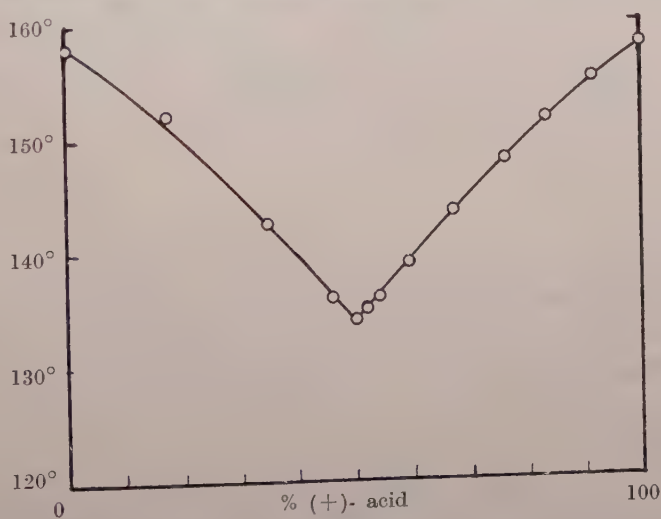


Fig. 1. Melting point diagram of the system (+)- and (-)- β -oxy- β -phenylpivalic acid.

that the inactive acid at the melting point constitutes a so-called *d*- and *l*-conglomerate. The identity of X-ray powder photographs of the active acid (fig. 2a) and the inactive acid (fig. 2b) shows that the latter is a conglomerate at room-temperature too. There are very few published melting point curves of optical isomerides forming conglomerates and according to a wellknown text-book of organic chemistry (1) no such diagrams are definitely known. However, there are at least two such cases reported. The antipodes of dilactyldiamide were found by VIÈLES (2) to form a conglomerate, and the melting point diagram of this

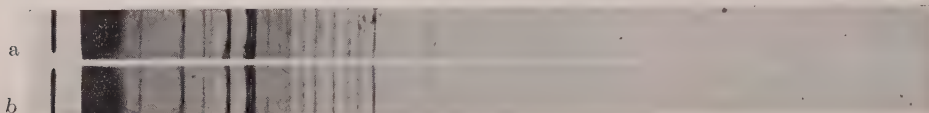
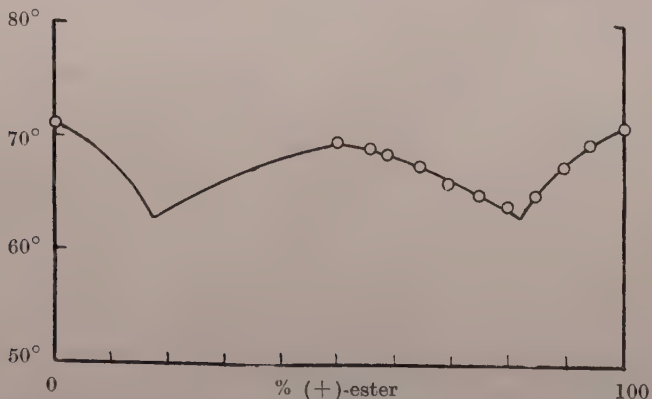


Fig. 2.

system indicates the existence of a conglomerate at the melting point. This diagram, however, having only a few points near the eutectic point and giving an irregular curve, does not definitely exclude the possibility of the existence of a true racemic compound occurring as a solid phase in a small interval. The other case has been reported by ROSS and SOMERVILLE (3) who found that *d*- and *l*-pinene gave a simple eutectic melting point curve. They studied several systems of optical isomerides in the camphor series and among these they found examples of all three main types of melting point curves: 1, the pseudo-racemic mixed crystal type; 2, the simple eutectic *d*- and *l*-conglomerate type; and 3, the true racemic compound type. From this investigation they concluded that strongly associating substances furnish curves in group 3; substances of feebly associating power furnish curves in group 1, and substances with no associating power may be found in group 2 or 1.

LANDRIEU (4) advanced the view that if the *d*- and *l*-isomerides could form ions, as in the case of acids and salts, they should also tend to form racemic compounds. If on the other hand they were nondissociable, they should form mixed crystals. Since polar substances are those which give associated compounds, the views of LANDRIEU and of ROSS and SOMERVILLE agree; and so they con-

Fig. 3. Melting point diagram of the methyl esters of (+)- and (-)- β -oxy- β -phenylpivalic acid.

clude (3) that «the fundamental reasons for the formation of racemic compounds are no better understood than those for the formation of associated substances, and it may be that electrical forces are the main factors in both.»

As the active β -oxy- β -phenylpivalic acid constitutes an obvious exception from this rule, it was of interest to study a related substance and therefore the methyl esters of both the inactive acid and the two antipodes were prepared. According to the theory mentioned above the active methyl ester being a much less polar compound than the acid, should not be expected to give a

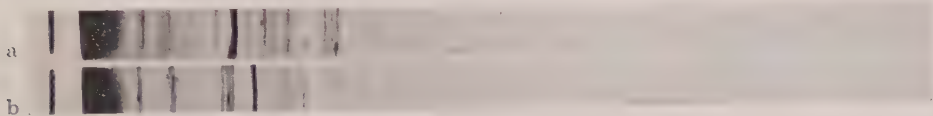


Fig. 4.

racemic compound. The melting point diagram (fig. 3) however shows that the antipodes form a true racemic compound at the melting point. X-ray powder photographs of the active ester (fig. 4 a) and the inactive ester (fig. 4 b) prove that the inactive ester is a true racemic compound at room-temperature, too. These contradictions to the theory of LANDRIEU, ROSS and SOMERVILLE are so definite that they bring the validity of the theory into question. It seems probable that the formation of racemic compounds and conglomerates is influenced not only by those factors mentioned above, but also by others which may be of purely sterical origin.

Experimental

The inactive β -oxy- β -phenylpivalic acid was prepared from ethyl- α -bromoiso-butyrate and benzaldehyde (5,6) and melted at 133.5–134°.

Preliminary experiments on resolution

Morphine yielded a crystalline salt, containing excess of (+)-acid. (+)-Phenethylamine yielded a crystalline salt suitable for isolation of the (–)-acid. Quinine, brucine, quinidine and cinchonidine yielded salts containing about equal parts of (+)- and (–)-acid. Strychnine and cinchonine did not give crystalline products.

(+)- β -Oxy- β -phenylpivalic acid

29.1 g inactive acid and 45.5 g morphine were dissolved in 1500 ml hot 25 % ethanol. On cooling the salt crystallized as white prisms. The salt was removed after 4 hours and several recrystallizations were carried out. A sample was taken after each recrystallization, the acid isolated and the melting point and rotatory power in glacial acetic acid were determined. The following series of crystallizations was obtained:

Crystallization	1	2	3	4	5	6
Weight of salt (g)	29.3	23.4	19.9	18.2	16.4	14.2
$[\alpha]_D^{25}$ of the acid	+3.6°	+4.5°	+7.2°	+9.0°	+9.9°	+9.8°
M. p. » » »	140°	145°	155°	157°	158°	158°

Analysis 0.3889 g air-dried salt was dried over P_2O_5 . Weight reduction:

0.0141 g.

$C_{11}H_{14}O_3$, $C_{17}H_{19}NO_3$, H_2O H_2O calc. 3.62 found 3.63

0.02258 g water-free salt: 0.05759 g CO_2 and 0.01398 g H_2O

$C_{11}H_{14}O_3$, $C_{17}H_{19}NO_3$ calc. C 70.1 H 6.94

found » 69.6 » 6.93

14 g morphine salt yielded 4.1 g acid. The crude product was recrystallized from hot water. 3.6 g acid was collected as white prisms. (M. p. 157—158°)

0.3785 g (+)-acid: 19.20 ml 0.1020-N NaOH

E. W. calc 194.2 found 193.3

0.1038 g (+)-acid in glacial *acetic acid*, made up to 10.0 ml:

$3 \alpha_D^{25} = +0.305^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = +9.8^\circ$; $[M]_D^{25} = +19.0^\circ$

(—)- β -Oxy- β -phenylpivalic acid

The acid was liberated from the mother liquor of crystallization 1 above. 15.0 g of this acid, 8.8 g inactive acid and 15.0 g (+)-phenethylamine were dissolved in 1300 ml hot water. After 6 hours the salt was removed. A number of recrystallizations were carried out and from each a sample was taken as above. The following series of crystallizations was obtained:

Crystallization	1	2	3	4	5
Weight of salt (g)	18.0	13.4	10.5	9.0	8.0
$[\alpha]_D^{25}$ of the acid	-7.8°	-8.4°	-8.8°	-9.0°	-9.0°
M. p. » » »	155°	156°	157°	158°	158°

Analysis 0.3925 g air-dried salt was dried over P_2O_5 . Weight reduction:

0.0210 g.

$C_{11}H_{14}O_3$, $C_8H_{11}N$, H_2O H_2O calc. 5.40 found 5.35

0.02437 g water-free salt: 0.06414 g CO_2 and 0.01751 g H_2O

$C_{11}H_{14}O_3$, $C_8H_{11}N$ calc. C 72.3 H 7.99

found » 71.8 » 8.04

7.7 g salt yielded 4.4 g acid. The crude product was recrystallized from hot water. 4.1 g acid was collected as white prisms closely resembling the other antipode. It melted at 157—158°.

0.3986 g (—)-acid: 20.52 ml 0.1006-N NaOH

E. W. calc. 194.2 found 193.1

0.1086 g (—)-acid in glacial *acetic acid*, made up to 10.0 ml:

$3 \alpha_D^{25} = -0.294^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -9.0^\circ$; $[M]_D^{25} = -17.5^\circ$

0.0763 g (—)-acid in *ethanol*, made up to 10.0 ml:

$3 \alpha_D^{25} = -0.063^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -2.8^\circ$; $[M]_D^{25} = -5.3^\circ$

0.0983 g (—)-acid in *methanol*, made up to 10.0 ml:

$2 \alpha_D^{25} = -0.103^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -5.2^\circ$; $[M]_D^{25} = -10.2^\circ$

0.1233 g (—)-acid in *water*, neutralized with NaOH, made up to 10.0 ml:

$2 \alpha_D^{25} = -0.100^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -4.1^\circ$; $[M]_D^{25} = -7.9^\circ$

0.1021 g (—)-acid in *acetone*, made up to 10.0 ml:

$2 \alpha_D^{25} = -0.080^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -3.9^\circ$; $[M]_D^{25} = -7.6^\circ$

Methyl ester of β -Oxy- β -phenylpivalic acid

Diazomethane solution was slowly added to 1.9 g solid acid until the added solution was no longer decolorized. After evaporation of the solvent at room temperature 2.0 g methyl ester was collected as white needles, which melted at 68.5—69.5°.

Analysis 0.02235 g ester: 0.05655 g CO₂ and 0.01535 g H₂O

C₁₂H₁₆O₃ calc. C 69.2 H 7.74

found » 69.1 » 7.69

Methyl ester of (+)- β -Oxy- β -phenylpivalic acid

The methyl ester of the (—)-acid was obtained from the (+)-acid by methylation with diazomethane as above. It closely resembled the inactive ester and melted at 69—71°.

Analysis 0.02730 g ester: 0.06902 g CO₂ and 0.01921 g H₂O

C₁₂H₁₆O₃ calc. C 69.2 H 7.74

found » 69.0 » 7.87

0.1083 g ester in *chloroform*, made up to 10.0 ml:

3 α_D^{25} = + 1.00°; [α]_D²⁵ = + 30.8°; [M]_D²⁵ = + 64.1°

Methyl ester of (—)- β -Oxy- β -phenylpivalic acid

The ester was prepared from the (—)-acid as above. It resembled the inactive ester and melted at 69—70.5°.

Analysis 0.02836 g ester: 0.07161 g CO₂ and 0.01927 g H₂O

C₁₂H₁₆O₃ calc. C 69.2 H 7.74

found » 68.9 » 7.57

0.0963 g ester in *chloroform*, made up to 10.0 ml:

3 α_D^{25} = — 0.895°; [α]_D²⁵ = — 31.0°; [M]_D²⁵ = — 64.5°

0.0911 g ester in *methanol*, made up to 10.0 ml:

3 α_D^{25} = — 0.093°; [α]_D²⁵ = — 3.3°; [M]_D²⁵ = — 7.1°

0.0912 g ester in *ethylacetate*, made up to 10.0 ml:

3 α_D^{25} = + 0.006°; [α]_D²⁵ = + 0.2°; [M]_D²⁵ = + 0.5°

0.0946 g ester in *ethanol*, made up to 10.0 ml:

3 α_D^{25} = + 0.013°; [α]_D²⁵ = + 0.5°; [M]_D²⁵ = + 1.0°

0.0720 g ester in *acetone*, made up to 10.0 ml:

3 α_D^{25} = + 0.054°; [α]_D²⁵ = + 2.5°; [M]_D²⁵ = + 5.2°

Melting point diagrams

Melting point determinations were carried out according to RHEINBOLDT's method (7), FRIEDRICH'S melting point apparatus being used (8). The mixtures were prepared both by melting the components and by evaporation of solvent from ether solution of the components. The melting point data are found in tables 1 and 2.

Table 1.

(+)- and (—)- β -Oxy- β -phenylpivalic acid

% of (+)	M. p.
0.0	158°
17.2	152°
34.6	142.5°
45.8	136°
50.0	134°
51.8	135°
54.0	136°
59.1	139°
66.5	137.5°
76.2	148°
83.3	151.5°
91.5	155°
100.0	158°

Table 2.

Methyl esters of (+)- and (—)- β -Oxy- β -phenylpivalic acid

% of (+)	M. p.
0.0	71°
50.0	69.5°
55.8	69°
58.8	68.5°
64.4	67.5°
69.4	66°
74.8	65°
79.8	64°
84.5	65°
89.4	67.5°
94.0	69.5°
100.0	71°

X-ray photographs

Powder photographs were taken with monochromatic $\text{Cu-K}\alpha$ radiation (time of exposure: 2 hours), using a ground and bent monochromator of the GUINIER type (9). The focusing camera was of the multiple type (10), and the whole assembly was constructed by HÄGG (11) for use at the inorganic department of this institute.

SUMMARY

β -Oxy- β -phenylpivalic acid was resolved into the optical antipodes, and the rotatory power was determined in several solvents.

The methyl esters of β -oxy- β -phenylpivalic acid and its optical antipodes were synthesized by methylation with diazomethane of the corresponding acids. The rotatory power was determined in several solvents.

By means of melting point diagrams and X-ray powder photographs the system (+)- and (—)- β -oxy- β -phenylpivalic acid was shown to form a *d*- and *l*-conglomerate.

By the same methods the methyl esters of (+)- and (—)- β -oxy- β -phenylpivalic acid were shown to form a true racemic compound.

From the experimental results it was concluded that an earlier theory (3, 4) concerning the formation of *d*- and *l*-conglomerates and true racemic compounds is not generally valid.

Professor Arne Fredga suggested this investigation. I take the opportunity of expressing my sincere gratitude for his valuable advice and help. I also wish to acknowledge my indebtedness to professor Gunnar Hägg for placing X-ray apparatus at my disposal and for his valuable help. The expenses incurred in this investigation have been met by a grant from the Nobel Fund of the Royal Swedish Academy of Science (Kemiska prisgruppens särskilda fond).

Organic Department, Chemical Institute, University of Upsala, September 1949.

- REFERENCES: 1. **Holleman-Richter**, *Organische Chemie*, 25. Aufl., 190 (1944). — 2. **P. Vièles**, *Ann. Chim.* [11] 3, 143 (1935). — 3. **J. Ross** and **I. Somerville**, *J. Chem. Soc. (London)* 1926, 2770. — 4. **Ph. Landrieu**, *Bull. Soc. Chim. France* [4] 31, 1217 (1922.) — 5. **E. Blaise** and **A. Courtout**, *Bull. Soc. Chim. France* [3] 35, 591 (1906). — 6. **E. Blaise** and **I. Herman**, *Ann. Chim.* [8] 23, 532 (1911). — 7. **H. Rheinboldt**, *J. prakt. Chem.* [2] 111, 242 (1925). — 8. **F. Friedrichs**, *Z. Angew. Chem.* 34, 61 (1921). — 9. **A. Guinier**, *Ann. Phys.* [11] 12, 161 (1939). — 10. **P. M. de Wolff**, *Acta Cryst.* 1, 207 (1948). — 11. **G. Hägg**, Unpublished construction.

Tryckt den 19 december 1949



Mixed bismuth oxides with layer lattices

I. The structure type of $\text{CaNb}_2\text{Bi}_2\text{O}_9$

By BENGT AURIVILLIUS

With 5 figures in the text

In the course of a comprehensive investigation of mixed bismuth oxides, the system $\text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{TiO}_2$ was studied. At about 40 atomic % of TiO_2 a phase with a body-centered pseudo-tetragonal unit cell with $a = 3.84$ and $c = 32.8 \text{ \AA}$ was found. X-ray analysis (to be published later) seemed to show that the structure was built up of $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers paralell to the basal plane, and sheets of composition $\text{Bi}_2\text{Ti}_3\text{O}_{10}^{2-}$. The atomic arrangement within the $\text{Bi}_2\text{Ti}_3\text{O}_{10}^{2-}$ sheets seemed to be the same as in structures of the perovskite type and the structure could then be described as consisting of $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers between which double perovskite layers are inserted.

An attempt was then made to synthesize compounds where the $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers alternate with single perovskite layers. The general formula for such compounds could be expected to be: $(\text{MeBi})_6\text{R}_4\text{O}_{18}$. In actual fact compounds with this structure could be prepared with Me: Na K Ca Ba Sr Pb R: Ti Nb Ta.

Procedure: Weighed amounts of the appropriate oxides or carbonates were mixed and heated in platinum or gold crucibles to about 1000°C . A number of compounds with the general formula $(\text{Bi, Me})_6\text{R}_4\text{O}_{18}$ were prepared. Out of these the following were found to have a body-centered tetragonal or pseudo-tetragonal unit cell. The real unit cells, however, appeared to be face-centered-orthorhombic.

Composition	Orthorhombic description			Pseudo-tetragonal description	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>c</i>
$\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$	5.405	5.442	25.11	3.836	25.11
$\text{Bi}_3\text{TaTiO}_9$	5.402	5.436	25.15	3.832	25.15
$\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	5.435	5.485	24.87	3.860	24.87
$\text{SrBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	5.504	5.504	25.05	3.892	25.05
$\text{SrBi}_2\text{Ta}_2\text{O}_9$	5.509	5.509	25.06	3.895	25.06
$\text{BaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	5.533	5.533	25.55	3.912	25.55
$\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	5.492	5.503	25.53	3.887	25.53
$\text{KBi}_5\text{Nb}_4\text{O}_{18}$	5.506	5.506	25.26	3.893	25.26
$\text{NaBi}_5\text{Nb}_4\text{O}_{18}$	5.47	5.47	26.94	3.87	26.94

Single crystals were prepared from the $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ and $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ phases. Weissenberg photographs of $0kl$ and $1kl$ (pseudo-tetragonal cell) were taken. In the powder photographs of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ (Table 6a) the reflections 110 , 211 , 215 , 220 and 310 were clearly split up. No cleavage was found for the reflections $10l$, $20l$, and $30l$, (in all cases pseudo-tetragonal indices). From this it was concluded that the structure might be described by means of orthorhombic unit cells, having the same c axes as the pseudo-tetragonal cells, and a and b axes equal to the diagonals of the pseudo-tetragonal cells. Using orthorhombic units the Weissenberg photographs register hkl and $h, h+2, l$. In Table 6a the $\sin^2 \theta$ of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ are calculated on the assumption of an orthorhombic unit cell.

A few discrepancies occur between the intensities of the spots as found in the Weissenberg photographs (first layer) and in the powder photographs. In the Weissenberg photographs ($h, h+2, l$), no difference was found between reflections hkl and khl . From the powder photographs it is seen that 024 might be < 204 and that $311 < 131$ and $3111 < 1311$. The reason might be the orientation of the powder.

$\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ phase

The powder photographs of $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ (Table 6b) could be explained assuming a tetragonal cell with $a = 3.887 \text{ \AA}$ and $c = 25.53 \text{ \AA}$, but for two lines being split up, which indicated an orthorhombic unit cell with axes $a = 5.492$, $b = 5.503$ and $c = 25.53 \text{ \AA}$. As in $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$, it was thus assumed that the real symmetry is $D_{2h} - mmm$, though nothing in the Weissenberg photographs indicated a lower Laue symmetry than $D_{4h} - 4/mmm$. The observed density was 7.91 , thus allowing 4 formula units/unit cell ($d_{\text{calc.}} = 8.22$).

With the exception of the criterion for face-centering that hkl occurring only with h, k, l all odd or all even, no systematic extinctions were found. This is characteristic of the space groups D_{2h}^{23} , D_2^7 and C_{2v}^{18} .

Positions of the metal atoms

As the scattering factors for the Pb and the Bi atoms are almost the same, it makes no difference in the intensity calculations whether the Pb and the Bi atoms occupy separate positions or are mixed at random. Therefore no difference will be made between Pb and Bi; they will both be denoted by Me.

The intensities of the reflections seemed to depend mainly on the value of l (see Table 1a). It therefore seemed probable that at least the Me and the Nb atoms are placed along the lines: $(000; \frac{1}{2} \frac{1}{2} 0; \frac{1}{2} 0 \frac{1}{2}; 0 \frac{1}{2} \frac{1}{2}) + 00z$. The sum of $\sum_l I_{00l} \cos 2\pi lz$ and $\sum_l I_{11l} \cos 2\pi lz$ will under such conditions represent the

Patterson function along $00z$. In Fig. 1a these sums are plotted as functions of z . It is seen from the graph that high maxima occur for $z = 0.20$ and $z = 0.40$.

The unit cell of $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ contains 12 Me atoms and 8 Nb atoms.

If the space groups are assumed to be D_{2h}^{23} , D_2^7 or C_{2v}^{18} a or b , the only way of placing 12 Me atoms on the lines $00z$ is in one 4-fold and one 8-fold position. With these assumptions the only 4-fold positions possible are 000 or $00\frac{1}{2}$.

Table 1a

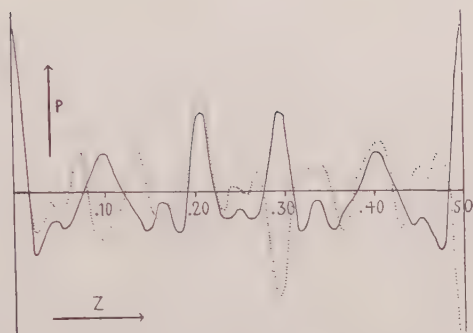
Weissenberg Photographs of $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$. Cu K_α radiation

The crystals form very thin plates, and therefore considerable absorption occurs. Spots in the vicinity of the lines described by WELLS (2) will therefore be weakened. The regions of maximum absorption are denoted by dotted lines. In the tables 1, 2 and 3 pseudo-tetragonal indices are used, and observed and calculated intensities for the reflections: $00l$, $10l$, $11l$, $20l$, and $21l$ are given. With orthorhombic description these reflections would have been denoted by: $00l$, $02l$ or $20l$, $22l$, $13l$ or $31l$.

l	I_1	I_2	I_{00l}	$I_{\text{obs.}}I_{11l}$	I_{20l}
2	18	1.2		vw	vw
4	9.0	34	m	m	w
6	0.1	8.4	vvw	m	—
8	25	14	m	w	w
10	350	340	vst	m^+	m
12	19	0.2	w	—	—
14	36	100	m^-	vvw	w
16	9.6	4.8	vw	—	—
18	45	31	m	w	w
20	280	230	st	m^+	m^+
22	22	0.04	—	—	—
24	71	200	m^-	m	m^+
26	27	14	w	vvw	vw
28	85	26	m	w	w
30	190	130	m	m	
32	25	8.4	w		
l	I_1	I_2	I_{10l}	$I_{\text{obs.}}I_{21l}$	
1	1.7	17	m	—	
3	20	6.3	m	vvw	
5	380	370	vst	st	
7	18	0.0	—	—	
9	12	63	m	w	
11	3.2	5.3	—	—	
13	32	23	w	vvw	
15	320	280	st	w	
17	20	0.2	—	—	
19	55	160	m^+	w^+	
21	18	7.8	vvw	—	
23	61	32	m	w^+	
25	230	170	m^+	m	
27	24	1.7	—	—	
29	85	250	m^-		
31	48	23	w		

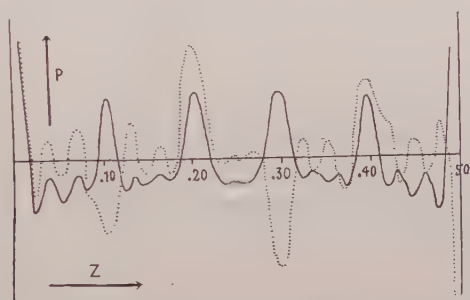
Table 1b
Weissenberg Photographs of $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$

Zero layer				First layer			
00 l	I'_1	$I_{\text{obs.}}$	I'_2	21 l	I'_1	$I_{\text{obs.}}$	I'_2
4	11	m	32	1	1.7	—	14
6	1.4	vw	1.4	3	18	vw	4.8
8	28	m	14	5	330	st	340
10	360	vst	360	7	18	—	0.4
12	45	w	11	9	23	w	67
14	50	m ⁺	88	11	4.8	—	3.6
16	6.3	vw	5.8	13	26	vw	23
18	70	m	38	15	300	w	280
20	280	st	230	17	13	—	0.3
22	25	—	0.4	19	42	w ⁺	150
24	58	m ⁺	250	21	14	—	7.8
26	21	w	10	23	66	w ⁺	36
28	85	m	21	25	210	m	170
30	240	m	120	27	23	—	2.9
32	17	w	6.8				
10 l	I'_1	$I_{\text{obs.}}$	I'_2	11 l	I'_1	$I_{\text{obs.}}$	I'_2
1	1.0	m	8.4	2	18	vw	1.2
3	14	m	4.0	4	9.0	m	34
5	320	vst	340	6	0.1	m	8.4
7	16	—	0.5	8	25	w	14
9	24	m	67	10	350	m ⁺	340
11	6.3	—	2.0	12	19	—	0.2
13	24	w	24	14	36	vw	100
15	310	st	280	16	9.6	—	4.8
17	13	—	0.5	18	45	w	31
19	42	m ⁺	150	20	280	m ⁺	230
21	14	vw	7.8	22	22	—	0.0
23	64	m	38	24	71	m	200
25	210	m	170	26	27	vw	14
27	23	—	2.9	28	85	w	26
29	81	m	220	30	190	m	130
31	32	w	24				
20 l	I'_1	$I_{\text{obs.}}$	I'_2				
2	12	vw	1.4				
4	10	w	36				
6	0.5	—	4.8				
8	31	w	14				
10	350	m	350				
12	41	—	7.8				
14	50	w	88				
16	6.3	—	6.3				
18	69	w	40				
20	280	m ⁺	230				
22	25	—	0.4				
24	59	m ⁺	240				
26	20	vw	11				
28	85	w	21				

Figure 1 a. Patterson function of $\text{PbV}_2\text{Bi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ along $00z$

Full curve: $\sum_l I_{00l} \cos 2\pi lz$

Dotted curve: $\sum_l I_{11l} \cos 2\pi lz$ (orthorhombic indices).

Figure 1 b. Patterson function of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ along $00z$

Of 8-fold positions only $\pm 00z$ is possible.

It was assumed arbitrarily that 4 Me occupy the position 000.

Using the distances found with the aid of the Patterson function, two possibilities for placing the Nb atoms arose:

- | | | |
|---------------------------|-------------|------------------------|
| 1. 8 Nb in $\pm 00\ 0.20$ | 4 Me in 000 | 8 Me in $\pm 00\ 0.40$ |
| 2. 8 Nb in $\pm 00\ 0.40$ | 4 Me in 000 | 8 Me in $\pm 00\ 0.20$ |

The two curves on the graph were added and the areas under the peaks at 0.20 and 0.40 calculated. The ratio 1.5:1 was found for 0.20/0.40.

In case 1, the ratio was calculated to be 0.91:1 and in case 2, 1.1:1 if the ratio $f_{\text{Nb}}/f_{\text{Bi}}$ was assumed to be 0.46. These figures cannot be compared directly with the observed ratio 1.5:1 since the zero level in figure 1 is of course uncertain. Case 2 agrees slightly better insofar as the peak at 0.20 is actually higher. It seemed, however, that the uncertainty in determining the areas was so large that case 1 could not be excluded by these measurements alone.

Case 1

In calculating the structure amplitudes z_{Nb} was varied around 0.20 and z_{Me} around 0.40. The average ratio $f_{\text{Nb}}/f_{\text{Me}}$ was assumed to be 0.46. The intensities were compared with calculated values of A^2 :

$A = 10 (\cos 2\pi lz_{\text{Me}} + 0.46 \cos 2\pi lz_{\text{Nb}} + 0.5) = 10 F/4 f_{\text{Me}}$. In this way the best values for the parameters were found to be:

$z_{\text{Me}} = 0.397 \pm 0.002$ and $z_{\text{Nb}} = 0.192 \pm 0.004$. In Table 1a $I_{\text{calc.}}$ is compared with the observed intensities.

Case 2

z_{Nb} was varied about 0.40 and z_{Me} around 0.20. The best values were found to be $z_{\text{Nb}} = 0.412 \pm 0.004$ and $z_{\text{Me}} = 0.202 \pm 0.002$.

The observed and calculated values are compared in Table 1a.

It was found that arrangement 2 accounted slightly better for the experimental data than 1. It must, however, be borne in mind that the intensity ratios of weak spots might be changed through the influence of the oxygen atoms and that this influence was neglected in the calculations. The differences did not seem to be as large as to allow a decision between 1 and 2. It was therefore tried to find possible oxygen positions both for 1 and 2. The results were then compared.

Case 1. Positions of the oxygen atoms

The positions of the metal atoms were assumed to be: $(000; 0\frac{1}{2}\frac{1}{2}; \frac{1}{2}0\frac{1}{2}; \frac{1}{2}\frac{1}{2}0) + 000$ (4 Me₁) ± 00 0.397 (8 Me₂) ± 00 0.192 (8 Nb). Since all point positions of D_{2d}^{23} can be described by positions of D_2^7 or $C_{2v}^{18}a$, only D_2^7 and $C_{2v}^{18}a$ have been considered.

At first only D_2^7 will be discussed. If the interatomic distances O—O, Me—O and Nb—O should not be smaller than 2.5, 2.2 and 1.8 Å, oxygen atoms could only be situated in the following positions:

$$\begin{array}{llll}
 4(b) \ 00\frac{1}{2} & 4(c) \ \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4} & 4(d) \ \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4} & 8(g) \ \pm 00z \\
 8(h) \ \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}-z & & & 0.086 \leq z \leq 0.122 \\
 & 0.039 \leq |z| \leq 0.061 & & 0.262 \leq z \leq 0.311 \\
 & 0.148 \leq |z| \leq 0.201 & & \\
 8(i) \ \frac{1}{4}y\frac{1}{4}; \frac{1}{4}\frac{1}{2}-y\frac{1}{4} & 8(j) \ x\frac{1}{4}\frac{1}{4}; \frac{1}{2}-x\frac{1}{4}\frac{1}{4} & & \\
 y = 0 & x = 0 & &
 \end{array}$$

An attempt was made to find positions for the oxygen atoms giving approximately regular octahedra around Nb, since from known structures containing Nb⁵⁺ and O²⁻ this seemed to be the normal configuration Nb⁵⁺—O²⁻. The maximum distance of contact Nb—O was assumed to be 2.5 Å.

With these assumptions 8(g) and 8(h) are the only positions where oxygen atoms in contact with Nb can be situated.

With oxygen atoms in three 8-fold positions 8(h) the distances O—O would be too short. It then only remains to consider the case of oxygen atoms in two 8-fold positions 8(g) and two 8 fold positions 8(h). For the oxygen

atoms in contact with Nb, reasonable interatomic distances were obtained assuming: 8 O₂ in 8(g) $z_2 = 0.100$ 8 O₃ in 8(g) $z_3 = 0.264$ 8 O₄ in 8(h) $z_4 = 0.168$ 8 O₅ in 8(h) $z_5 = 0.168$. Even if small adjustments of these parameters are admitted for the remaining 4 O there is room only in the position $00\frac{1}{2}$ (O₁).

With these assumptions the distances would be:

Me ₁ -4 O ₁ = 2.75	Me ₂ -4 O ₂ 2.75	Nb-O ₂ = 2.34
Me ₁ -2 O ₂ = 2.55	Me ₂ -2 O ₄ 2.55	Nb-2 O ₄ = 2.04
	Me ₂ -2 O ₅ 2.55	Nb-O ₅ = 2.04
O ₄ -4 O ₅ = 2.74		Nb-O ₃ = 1.84
O ₃ -2 O ₄ = 2.60		
O ₃ -2 O ₅ = 2.60		
O ₁ -2 O ₂ = 2.55		

It is seen that the positions given might equally well be described by D_{2h}²³ or if the pseudo-tetragonal unit cell ($a = 3.89$ $c = 25.53$ Å) is chosen by D_{4h}¹⁷.

As $a \sim b$ and the positions of the oxygen atoms must be chosen from space considerations, the discussion will be the same for C_{2v}^{18a} as for C_{2v}^{18b}. For C_{2v}^{18a} it is found that the oxygen atoms can be only in the planes $y = 0$ $y = 0.25 \pm 0.03$ $y = \frac{1}{2}$ and $y = 0.75 \pm 0.03$. For $y = 0$ or $\frac{1}{2}$, z must either be 0 or $\frac{1}{2}$ or lie between the limits $0.049 < |z| < 0.451$, otherwise the distance O-O will be < 2.5 Å. For $y = \frac{1}{4}$ or $\frac{3}{4}$, z must have the values 0, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ or $\frac{3}{4}$ or lie between the limits $0.049 < |z| < 0.201$ $0.299 < |z| < 0.451$.

In figure 2a sections of the unit cell are made for $y = 0$ and $y = \frac{1}{4}$. Possible regions with space group C_{2v}^{18a} are denoted in the figure by shaded areas. For these areas the distances O-O ≥ 2.5 Me-O ≥ 2.2 and Nb-O ≥ 1.8 Å.

With space group C_{2v}^{18a} it thus seems that no basically new atomic positions are obtained, although this symmetry allows the atoms to be slightly shifted from the positions of D₂⁷.

In Table 1 the intensities have been calculated from the parameters found and compared with the observed ones. (The calc. intensities are denoted by I_i). The mode of calculation is shown by the calculation of I₀₀₁. $I = A^2$.

$A = 10 (0.5 + \cos 2\pi lz_{\text{Me}} + (f_{\text{Nb}}/f_{\text{Me}}) \cos 2\pi lz_{\text{Nb}} + (f_{\text{O}}/f_{\text{Me}}) (0.5 + \cos 2\pi lz_2 + \cos 2\pi lz_3 + 2 \cos 2\pi lz_4))$. Since the ratios $f_{\text{Nb}}/f_{\text{Me}}$ and $f_{\text{O}}/f_{\text{Me}}$ vary with $\sin \theta/\lambda$ they were interpolated from values given in the *International Tables* (1).

Case 2. Positions of the oxygen atoms

The positions of the metal atoms were assumed to be: $(000; \frac{1}{2}\frac{1}{2}0; 0\frac{1}{2}\frac{1}{2}; \frac{1}{2}0\frac{1}{2}) + 000$ (4 Me₁) ± 00.0202 (8 Me₂) ± 00.0412 (8 Nb).

With D₂⁷ the following positions are available for the oxygen atoms 4(b) $00\frac{1}{2}$

8(g) $\pm 00z$	8(h) $\frac{1}{4}\frac{1}{4}z, \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}-z$
$0.086 \leq z \leq 0.116$	$0.039 \leq z \leq 0.161$
$0.288 \leq z \leq 0.342$	
4(c) $\frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4}$	4(d) $\frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4}$
	16(k) $xyz, \bar{x}\bar{y}z, x\bar{y}\bar{z}, \bar{x}y\bar{z}$
	$x = 0$ $x = 0.25 \pm 0.03$
	$y = 0.25 \pm 0.03$ or $y = 0$
	$z \sim 0.135$.

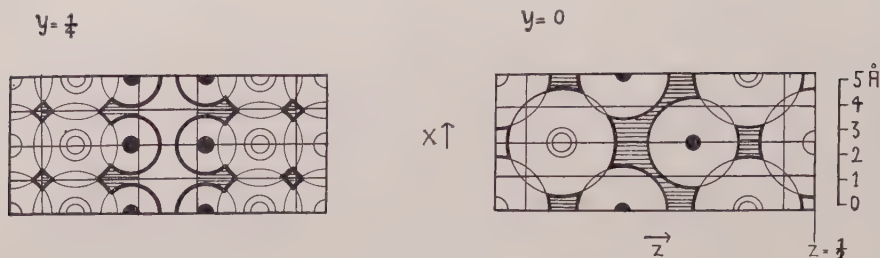


Figure 2a (see Case 1 in the text.)

The projection of the positions of the Nb, Me₁ and Me₂ atoms on the planes $y=0$ and $y=\frac{1}{4}$ are denoted by: black circles, white circles and double circles respectively.

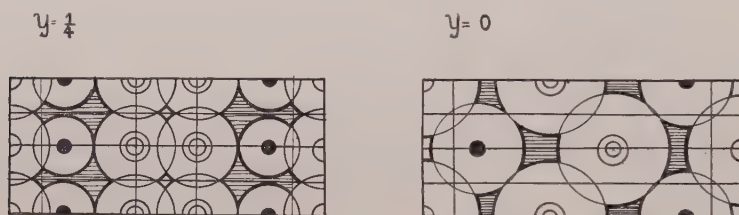


Figure 2b (see Case 2 in the text.)

It was found that oxygen atoms in the positions 4(c), 4(d) or 16(k) could not be part of an octahedron around Nb. With O in the remaining positions 4(b), 8(g) and 8(h), octahedra around Nb might be achieved in the following ways: ($1.8 \leq \text{Nb-O} \leq 2.5$).

With oxygen atoms in three 8-fold positions 8(h), it seemed impossible to find positions for the remaining 12 oxygen atoms giving O-O distances ≤ 2.5 Å.

With two 8-fold positions 8(h) + 4(b) + one 8-fold position 8(g) the following positions were assumed for oxygen atoms in contact with Nb:

$$\begin{array}{lll} 4 \text{ O}_1 \text{ in } 4(b) & 8 \text{ O}_2 \text{ in } 8(g) & z = 0.324 \\ 8 \text{ O}_3 \text{ in } 8(h) & z = 0.088 & 8 \text{ O}_4 \text{ in } 8(h) \quad z = -0.088. \end{array}$$

For the remaining 8 oxygen atoms there was only room in the positions 4(c) and 4(d). (O₅, O₆).

With the above assumptions the distances would be:

$$\begin{array}{lll} \text{Me}_1-4 \text{ O}_1 = 2.75 & \text{Me}_2-2 \text{ O}_5 = 2.29 & \text{Nb}-\text{O}_1 = 2.24 \\ \text{Me}_1-4 \text{ O}_3 = 2.96 & \text{Me}_2-2 \text{ O}_6 = 2.29 & \text{Nb}-2 \text{ O}_3 = 1.94 \\ \text{Me}_1-4 \text{ O}_4 = 2.96 & \text{Me}_2-4 \text{ O}_2 = 2.82 & \text{Nb}-2 \text{ O}_4 = 1.94 \\ & & \text{Nb}-\text{O}_2 = 2.24 \\ \\ \text{O}_5-4 \text{ O}_6 = 2.75 & \text{O}_2-2 \text{ O}_5 = 2.70 & \text{O}_2-2 \text{ O}_3 = 2.96 \\ \text{O}_3-4 \text{ O}_4 = 2.75 & \text{O}_2-2 \text{ O}_6 = 2.70 & \text{O}_2-2 \text{ O}_4 = 2.96 \\ & \text{O}_1-4 \text{ O}_3 = 2.96 & \\ & \text{O}_1-4 \text{ O}_4 = 2.96 & \end{array}$$

The above positions might be equally well described by D_{2h}²³ or if a pseudo-tetragonal unit cell is assumed ($a = 3.89$ $c = 25.53$) by D_{4h}¹⁷.

In Figure 2b sections are made of the unit cell for $y = 0$ and $y = \frac{1}{4}$ showing the positions possible for the oxygen atoms if the space group $C_{2v}^{18}a$ is assumed. Possible regions are denoted by shaded areas. It was found that only with oxygen atoms situated near the positions given above, could octahedra of O around all Nb atoms and reasonable distances O—O be attained.

Thus no new arrangements were found when space group $C_{2v}^{18}a$ was assumed.

In Table 1 the intensities are calculated from the parameters given above. The calculated intensities are denoted by I_2' . The mode of calculation is the same as was used in case 1. It is seen from the Table that both 1 and 2, in which cases the influence of the oxygen atoms was neglected, account fairly well for the experimental data. From this follows that the calculated intensities I_1' and I_2' , where regard was taken to the O atoms, do not differ much either. Although the ratio 211:213 (see Table 1 (pseudo-tetragonal indices)) is best described by 1', 2' on the whole seemed to satisfy the observed intensities best (see for instance the intensity ratios 112:114 116:118 202:204 101:103 and 107:109). No definite conclusions could however be drawn from the study of $PbBi_2NbO_9$ alone.

Bi_3NbTiO_9

Just as for $PbBi_2Nb_2O_9$, there was nothing in the Weissenberg photographs to indicate a lower Laue symmetry than $D_{4h}-4/mmm$. From the powder photographs (Table 6a) it is however seen that the actual unit cell is orthorhombic with axes $a = 5.405$ $b = 5.442$ $c = 25.11$ Å.

The intensities of the spots in the Weissenberg photographs indicate that the metal atoms are probably placed on the lines $00z$. The Patterson function (Fig. 1b) showed high maxima at 0.20 and 0.40. If the same assumptions are made as for $PbBi_2Nb_2O_9$ the following arrangements seemed to be possible:

A. 4 Nb in 000	B. 4 Ti in 000	C_1 4 Bi in 000
8 BiTi in $\pm 00z_1$	8 BiNb in $\pm 00z_1$	8 NbTi in $\pm 00z_1$
8 BiTi in $\pm 00z_2$	8 BiNb in $\pm 00z_2$	8 Bi in $\pm 00z_2$
C_2 4 Bi in 000		
8 NbTi in $\pm 00z_2$	$z_1 \sim 0.20$	$z_2 \sim 0.40$
8 Bi in $\pm 00z_1$		

The areas under the peaks at 0.20 and 0.40 were calculated as for $PbBi_2Nb_2O_9$ and the ratio 0.20/0.40 was found to be 1.4. The calculated ratios for A, B, C_1 and C_2 were 1.0, 1.0, 0.84 and 1.2. The area ratio for C_2 agreed best with the observed one. The differences are however small, so that all alternatives were considered. The intensities were calculated as for $PbBi_2Nb_2O_9$. The ratios f_{Ti}/f_{BiNb} , f_{Nb}/f_{BiTi} and f_{NbTi}/f_{Bi} were assumed to be 0.26, 0.57 and 0.34. The calculated and observed intensities for A and B are compared in Table 2. In these calculations the influence of the oxygen atoms was neglected. The best agreement was found for

	z_1	z_2
A	0.198	0.400
B	0.196	0.400

Table 2
Weissenberg photographs of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$.

l	I_A	I_B	I_{00l}	$I_{\text{obs.}}I_{11l}$	I_{20l}
2	4.0	12	—	vvw	vw
4	7.3	22	m	st	m ⁻
6	2.3	5.3	w	st	m
8	7.3	22	m	w	m
10	510	440	st	st	st
12	1.4	2.6	w	—	vw
14	15	52	m ⁺	vw	w
16	0.2	0.0	w	vw	—
18	11	30	m ⁺	w	vw
20	500	400	st	st	m ⁺
22	0.1	0.4	—	—	—
24	27	94	m	m	m
26	0.5	2.0	w	m	m
28	14	31	m	m ⁺	m ⁻
30	490	350	m	m ⁺	
l	I_A	I_B	I_{10l}	I_{21l}	
1	4.4	12	st	m ⁺	
3	5.8	17	m	vw	
5	520	450	vst	vst	
7	2.6	6.3	—	—	
9	11	35	m	m	
11	0.8	1.4	w	w	
13	9.0	27	vw	w	
15	510	420	st	w	
17	0.6	0.3	—	—	
19	20	70	w	w	
21	0.0	0.5	w	w	
23	12	31	m	m	
25	500	380	m ⁺	m ⁺	
27	0.0	3.2	—	—	
29	34	120	m		
31	1.4	4.4	m		

From Table 2 it is seen that A and B account quite well for the observed intensities.

With A and B, Bi and Ti or Bi and Nb would occupy the same point position. This seemed *a priori* unlikely and if it was assumed that $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ and $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ were built up in the same way, arrangements A and B would imply that Pb, Bi and Nb were distributed over one point position, in $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$. Therefore, although arrangements A and B cannot be excluded from intensity discussions alone, they seem very improbable and will not be dealt with in the following.

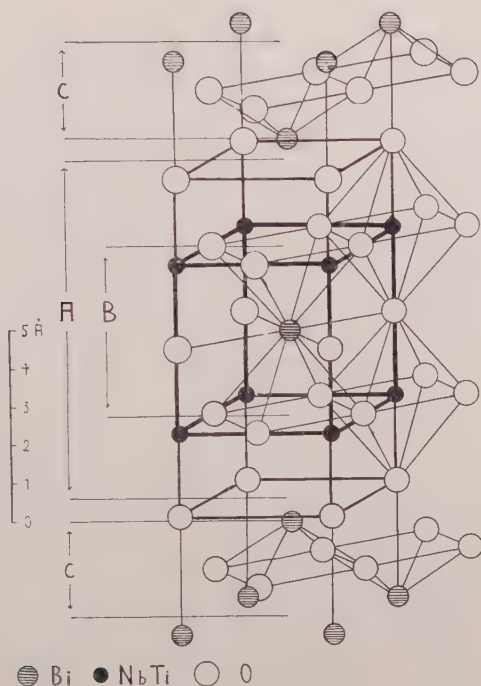


Figure 3.

One half of the pseudo-tetragonal unit cell of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ (from $z \sim 0.25$ to $z \sim 0.75$). A denotes the perovskitic layer BiNbTiO_3 , C Bi_2O_2 layers and B the unit cell of a hypothetical perovskite structure $\text{BiNb}_{0.5}\text{Ti}_{0.5}\text{O}_3$.

Case C'_1

The following positions were assumed: 4 Bi in 000, 8 Bi in $\pm 00\ 0.396$, 8 NbTi in $\pm 00\ 0.192$. By the same arguments as used for $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$, the following positions were arrived at:

$$\begin{array}{lll} 4\ \text{O}_1 \text{ in } 00\frac{1}{2} & 8\ \text{O}_2 \text{ in } \pm 00\ 0.092 & 8\ \text{O}_3 \text{ in } \pm 00\ 0.268 \\ 8\ \text{O}_4 \text{ in } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}-z & z = 0.164 & \\ 8\ \text{O}_5 \text{ in } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}-z & z = -0.164. & \end{array}$$

In Table 3 the intensities are calculated from these parameters.

Case C'_2

4 Bi in 000, 8 Bi in $\pm 00\ 0.200$ and 8 NbTi in $\pm 00\ 0.412$ were assumed. In case 2' (see $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$) the parameters for the oxygen atoms would be 4 O_1 in $00\frac{1}{2}$, 8 O_2 in $\pm 00\ 0.324$, 4 O_5 in $\frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4}$,

$$\begin{array}{lll} 4\ \text{O}_6 \text{ in } \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4}, & 8\ \text{O}_4 \text{ in } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}-z & z = 0.088 \\ & 8\ \text{O}_3 \text{ in } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}-z & z = -0.088 \end{array}$$

Table 3
Weissenberg photographs of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$

Zero layer				First layer			
00l	$I_{C'_1}$	$I_{\text{obs.}}$	$I_{C'_2}$	21l	$I_{C'_1}$	$I_{\text{obs.}}$	$I_{C'_2}$
4	13	m	36	1	2.6	m^+	22
6	0.5	w	10	3	35	vw	6.3
8	48	m	16	5	290	vst	300
10	310	st	330	7	19	—	1.0
12	46	w	12	9	27	m	55
14	38	m^+	59	11	3.6	w	18
16	2.6	w	29	13	52	w	26
18	100	m^+	48	15	270	w	270
20	240	st	240	17	6.8	—	0.8
22	12	—	0.5	19	45	w	90
24	42	m	140	21	14	w	40
26	29	w	42	23	110	m	46
28	100	m	35	25	200	m^+	200
30	190	m	150				

10l	$I_{C'_1}$	$I_{\text{obs.}}$	$I_{C'_2}$	11l	$I_{C'_1}$	$I_{\text{obs.}}$	$I_{C'_2}$
1	2.0	st	17	2	34	vvw	2.6
3	29	m	5.3	4	2.9	st	41
5	270	vst	300	6	6.8	st	69
7	17	—	1.2	8	62	w	22
9	29	m	56	10	360	st	310
11	5.8	w	15	12	14	—	1.0
13	49	vw	28	14	29	vw	76
15	270	st	270	16	10	vw	40
17	5.3	—	0.6	18	64	w	16
19	44	w	92	20	250	st	210
21	16	w	38	22	21	—	0.0
23	110	m	46	24	66	m	92
25	200	m^+	200	26	32	m	61
27	4.4	—	1.2	28	130	m^+	27
29	65	m	110	30	150	m^+	200
31	41	m	76				

20l	$I_{C'_1}$	$I_{\text{obs.}}$	$I_{C'_2}$
2	18	vw	2.9
4	12	m^+	37
6	0.1	m	16
8	48	m	17
10	300	st	320
12	33	vw	5.8
14	37	w	58
16	2.6	—	31
18	100	vw	45
20	240	m^+	240
22	12	—	0.5
24	42	m	140
26	29	m	45
28	100	m^+	35

In Table 3 the intensities are calculated with these assumptions.. It is seen from the Table that with C_1' the order of the reflections 101:103, 211:213, 202:204 and 107:109 are reversed. The same result was obtained if the influence of the oxygen atoms was neglected. If z_{Bi} and z_{NbTi} were varied around 0.396 and 0.192 so as to give correct ratios for some of these reflections, large discrepancies occurred for other reflections. With C_2' the intensities turned out to be of the right order. There are however a few discrepancies. 00 20 is certainly stronger than 0018 and $00\ 30 > 0028$, but the calculated ratios seem to be too large. On the whole the agreement is however good.

Thus if the X ray data for only one of $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ or $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ were considered, different atomic arrangements appeared to be possible, whereas only 2' seems to explain the observed data both for $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ and $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$.

With orthorhombic description the positions will be:

$D_{2h}^{23} - mmm$

$(000; 0\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}; \frac{1}{2}\ 0\ \frac{1}{2}; \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}\ 0) +$

4 Bi_1 (Me_1)	in	4 (a)	000
8 Bi_2 (Me_2)	in	8 (i)	$\pm\ 00\ 0.200\ (0.202)$
8 NbTi (Nb)	in	8 (i)	$\pm\ 00\ 0.412\ (0.412)$
4 O_1	in	4 (b)	$00\ \frac{1}{2}$
8 O_2	in	8 (i)	$00\ 0.324\ (0.324)$
8 O_3	in	8 (f)	$\frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ \frac{1}{4}; \frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ \frac{3}{4}$
16 O_4	in	16 (j)	$\frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ z; \frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ \bar{z}; \frac{1}{4}\ \frac{3}{4}\ z; \frac{1}{4}\ \frac{3}{4}\ \bar{z}$
$z = 0.088.$			

With pseudo-tetragonal description the positions will be:

$D_{4h}^{17} - I\ 4/mmm$

$(000; \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}) +$

2 Bi_1 (Me_1)	in	2 (a)	000
4 Bi_2 (Me_2)	in	4 (e)	$\pm\ 00\ 0.200\ (0.202)$
4 NbTi (Nb)	in	4 (e)	$\pm\ 00\ 0.412\ (0.412)$
2 O_1	in	2 (b)	$00\ \frac{1}{2}$
4 O_2	in	4 (e)	$\pm\ 00\ 0.324\ (0.324)$
4 O_3	in	4 (d)	$0\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{4}; \frac{1}{2}\ 0\ \frac{1}{4}$
8 O_4	in	8 (g)	$\pm\ (0\ \frac{1}{2}\ z; \frac{1}{2}\ 0\ z)\ z = 0.088.$

Table 4

Values of the tolerance factor, t , for different compounds having the $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ structure.

Compound	$t \cdot 100$
$\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$	91
$\text{Bi}_3\text{TaTiO}_9$	91
$\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	91
$\text{SrBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	99
$\text{SrBi}_2\text{Ta}_2\text{O}_9$	99
$\text{BaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	106
$\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$	101
$\text{NaBi}_5\text{Nb}_4\text{O}_{18}$	91
$\text{KBi}_5\text{Nb}_4\text{O}_{18}$	97

Table 5

Powder photographs of $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ and $\text{SrBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$. Cr K radiation. Pseudo-tetragonal indices.

$\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$				
hkl	$I_{\text{obs.}}$	I_{α}	I_{β}	I_{γ}
006	—	8.4	0.8	0.01
008	m	61	9.6	0.6
114+0010	(m)	230	230	230
0012	—	0.5	19	47
0014	vw	29	46	56
0016	vw	2.6	0.6	4.0
0018	w	100	34	13
101	—	1.2	0.5	2.9
103	st	36	1.4	1.4
105	vst	200	200	200
107	w	21	0.3	7.8
109	vvw	18	32	43
1011	—	7.0	0.2	0.5
1013	m ⁺	79	19	4.4
2010+1015	(st)	160	160	160
2111+1017	(w)	22	0.2	9.0
112	—	26	0.04	4.8
0010+114	(m)	4.4	14	22
116	w	4.4	17	26
118	m	69	13	1.7
204+1110	(st)	200	200	200
1112	—	22	0.1	8.4
1114	w	41	61	72
202	w	27	0.1	4.4
1110+204	(st)	3.6	13	20
206	w	3.2	0.04	1.4
215+208	(st)	59	9.0	0.5
1015+2010	(st)	220	220	220
2012	vw	1.4	15	41
211	w	0.1	2.3	6.3
213	w	38	2.0	1.0
208+215	(st)	210	210	210
217	—	21	0.3	7.8
219	vvw	18	33	43
1017+2111	(w)	4.4	0.01	1.4

$\text{SrBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$				
006	—	3.2	0.1	0.2
008	vw	45	11	2.6
114+0010	(m)	260	260	260
0012	vw	0.2	16	35
0014	m	42	58	64
0016	—	0.3	1.4	4.4
0018	w	83	35	18
0020	st	150	160	160

Table 5 (cont.)

	<i>h k l</i>	<i>I</i> _{obs.}	<i>I</i> _α	<i>I</i> _β	<i>I</i> _γ
	1 0 1	—	0.0	2.0	4.0
	1 0 3	vw	24	2.0	0.1
	1 0 5	st	230	240	230
	1 0 7	—	12	0.01	3.6
	1 0 9	w	28	42	49
	1 0 11	—	2.3	0.01	0.8
	1 0 13	m	61	20	8.4
	2 0 10+10 15	(st)	190	200	200
β 0 0	2 0+2 2 0+10 17	(m)	13	0.01	4.0
	1 0 19	m	88	110	120
	1 1 2	—	16	0.3	1.7
0 0 10+	1 1 4	(m)	10	20	26
	1 1 6	vw	10	22	29
	1 1 8	w	52	14	4.4
	1 1 10	st	230	240	230
	1 1 12	—	13	0.0	3.6
	1 1 14	w	56	74	81
	1 1 16	—	0.1	4.0	8.4
	1 1 18	m	40	10	2.3
	2 0 2	—	17	0.4	1.4
	2 0 4	—	9.0	19	24
	2 0 6	—	0.5	0.6	2.3
β 1 1	1 4+2 0 8	(w)	43	10	2.3
	1 0 15+2 0 10	(st)	250	260	250
β 2 1	1 3+2 0 12	(vw)	0.01	12	29
	2 0 14	w	42	58	64
	2 0 16	—	0.2	1.7	4.8
	2 1 1	w	0.6	4.8	7.8
	2 1 3	w	26	2.6	0.01
	2 1 5	st	240	240	240
	2 1 7	—	12	0.01	3.6
	2 1 9	vw	27	42	49
	2 1 11	—	1.2	0.4	2.0
	2 1 13	m	59	19	7.8
2 0 10+	2 1 15	(st)	190	190	190

One half of the pseudo-tetragonal unit cell is pictured in figure 3. As mentioned in the discussion on $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$, it was impossible in this phase to determine how Pb and Bi are distributed over the point positions 000 and 00 0.202. It therefore seemed of interest to try to determine the positions of Ca, Sr, Ba and K in the compounds $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$, $\text{SrBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$, $\text{BaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ and $\text{KBi}_5\text{Nb}_4\text{O}_{18}$. As the cell dimensions of the Pb, Ca, Sr, Ba and K compounds do not differ much it was assumed that the parameters of $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ are also valid for the other compounds. There were three extreme ways of distributing Ca, Sr, Ba and K over the positions 000 and 00 0.202:

- α Only Bi in 00 202
- β Random distribution
- γ Only Bi in 000.

Table 6 a

Powder photographs of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$. Cr K radiation.

Orthorhombic indices.

hkl	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{calc.}}$	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{obs.}}$	$I_{\text{obs.}}$	hkl	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{calc.}}$	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{obs.}}$	$I_{\text{obs.}}$
111	0914	0909	m	0214	5856)	5874	m
113	1080	1072	w ⁺	2014	5878)		
008	1333	1319	w ⁺	—	—	5990	vw
115	1414	1413	vst	139	6128	6129	w ⁺
020	1774	1767	m ⁺	319	6172	6175	w ⁺
200	1796	1790	m	—	—	6250	vvw
0010	2083	2078	m	2212	6569	6573	vvw
204	2129)	2131	w	0018	6747	6747	vw
β 119	2136)			1311	6961	6961	w
—	—	2324	vvw	040	7097)		
026	2524	2530	m	0216	7105)	7097	m
206	2546	2546	m	2016	7127)		
119	2580	2585	m	042	7180)		
—	—	2739	vvw	400	7185)	7182	m
028	3107)	3129	w	β 240	7357)		
208	3129)			β 420	7420)	7388	w
1111	3413	3415	w	044	7430)		
—	—	3523	w	2214	7652	7648	w
220	3570	3576	st	046	7847	7836	vw
222	3653)			406	7935)		
β 1113	3654)	3648	vw	1313	7960)		
0210	3857)	3860	st	3113	8004)	8005	w
2010	3879)			331	8054)		
0014	4082)	4089	w	0020	8330	8330	m
β 135	4103)			1119	8411)	8409	m
—	—	4236	vw	048	8430)		
226	4320	4324	w	2018	8543)	8558	st
1113	4412	4414	w	335	8554)		
131	4462	4454	w ⁻	240	8887)	8888	m
311	4506	4504	vw	2216	8901)		
β 1115	4621)	4623	w	420	8959)	8963	m
133	4628)			242	8970)		
313	4672)	4676	w	1315	9127	9105	st
β 2210	4679)			3115	9171	9156	vst
228	4903	4896	w	0410	9180	9189	m
135	4962	4956	st	4010	9268)	9264	m
315	5006	5006	st	424	9292)		
1115	5579	5581	st	426	9709)	9712	w
2210	5653	5652	st	339	9720)		

The intensities were calculated for these possibilities by calculations similar to those for $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$, and compared with the observed ones. See Table 5. It was found that in no case did γ explain the observed intensities. For the Sr, Ba and K compounds the observed intensities did not permit any decision between α and β . For $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$, however, only α seemed to give correct intensities. It was therefore concluded that the compounds discussed have the α arrangement.

Table 6b

 Powder photographs of $\text{PbBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$. Cr K radiation.

Pseudo-tetragonal indices.

$h k l$	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{calc.}}$	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{obs.}}$	$I_{\text{obs.}}$	$h k l$	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{calc.}}$	$10^4 \sin^2 \theta_{\text{obs.}}$	$I_{\text{obs.}}$
101	0889	0892	vw	11 14	5682	5699	m
103	1050	1052	vvw	219	5974	5990	m
008	1288	1285	vvw	00 18	6520	6529	w
105	1372	1371	vst	00 20	6663)	6664	vvw
110	1738	1753	m	10 17	6685)		
00 10	2012	2019	m	11 16	6889)	6924	m
114	2060)	2068	vvw	β 305	6903)		
β 109	2069)			220	6950	6934)	m
116	2462	2469	m			6976)	m
109	2499	2499	m	20 14	7419	7435	m
β 200	2877)	2881	m	21 13	7744	7749	m
00 12	2898)			301	7839	7846	vw
118	3026	3028	w	00 20	8049	8052	m
10 11	3304	3300	vvw	10 19	8133	8131	m+
200	3475	3475	st	228	8238)	8268	vw
11 10	3750	3755	st	11 18	8258)		
00 14	3944	3946	w+	305	8332	8339	m+
10 13	4269	4270	w+	310	8688	8673)	m+
211	4364	4355	vvw			8690)	m+
208	4763	4770	vvw	21 15	8872	8874	st
215	4847	4850	st	22 10	8962)	8980	m
10 15	5397	5416	st	314	9010)		
20 10	5487	5493	st	309	9449	9450	vvw

The structure of $\text{Bi}_3\text{NbTiO}_9$ is thus built up of $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers between which BiNbTiO_7^{2-} layers are inserted. The structure may be looked upon as a perovskite structure where perovskite layers are separated by $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers. This view was supported by the fact that in all cases where the above structure was observed the radii of the ions in the layers lying between the $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers would allow for the formation of a perovskite structure. If the tolerance factor t is calculated from the ionic radii of the elements constituting the layers between the $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2-}$ layers, it is found to lie between the limits 0.9 and 1.1 (see Table 4), the same limits within which perovskite structures are found to be stable.

t was calculated from the formula: $1.06 (R_A + R_O) = 0.95 t \sqrt{2} (R_B + R_O)$. (See (3).)

$$A = (\text{K} + \text{Bi})/2 \text{ Ca, Sr, Ba etc.}$$

$$B = (\text{Nb} + \text{Ti})/2 (\text{Ta} + \text{Ti})/2 \text{ Nb, Ta.}$$

In the calculations case α was assumed. For calculating t the following values for the ionic radii were used: Bi^{3+} 1.00, Ba^{2+} 1.39, Sr^{2+} 1.20, Ca^{2+} 1.02, Pb^{2+} 1.26, Na^+ 0.97, K^+ 1.33, Nb^{5+} 0.69, Ta^{5+} 0.69, Ti^{4+} 0.66 and O^{2-} 1.36. If, for instance, 1 K + 1 Bi are distributed over one 2-fold position the radius of (K, Bi) was taken as $(r_K + r_{\text{Bi}})/2$.

The structure proposed for $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ reminds one of the structure of beyerite $\text{CaBi}_2\text{O}_2(\text{CO}_3)_2$ described by LAGERCRANTZ and SILLÉN (4). The unit cell of beyerite is body-centered tetragonal with $a = 3.767$ and $c = 21.690$ Å. The positions of the Ca and the Bi atoms in beyerite are Ca 000 and $\text{Bi} \pm 00\ 0.19$ (space group D_{4h}^{17}) as compared with $a = 3.860$ $c = 24.87$, Ca in 000 and Bi in $\pm 00\ 0.20$ for $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$.

The "rotating" CO_3^{2-} groups in beyerite correspond to octahedral sheets $\text{Nb}_4\text{O}_7^{14}$ in $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$. Following the notations given by LAGERCRANTZ and SILLÉN (4) the structure described above might also be denoted by X_{11} .

SUMMARY

A series of tetragonal or pseudo-tetragonal phases of general composition $(\text{Bi}, \text{Me})_6\text{R}_4\text{O}_{18}$ have been investigated.

Me: Na, K, Ca, Sr, Ba, Pb.

R: Nb, Ta, Ti.

The positions of the Me and R atoms were determined from the observed intensities and the positions of the O atoms were deduced from space considerations.

The following structure is proposed:

$D_{2h}^{23} - F\ mmm$

$(000; 0\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}; \frac{1}{2}\ 0\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}; \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}\ 0) +$

4 Bi in 4 (a) 000

8 Bi in 8 (i) $\pm 00\ 0.200$

8 NbTi in 8 (i) $\pm 00\ 0.412$

4 O in 4 (b) $00\ \frac{1}{2}$

8 O in 8 (i) $\pm 00\ 0.324$

8 O in 8 (f) $\frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ \frac{1}{4}; \frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ \frac{3}{4}$

16 O in 16 (j) $\frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ z; \frac{1}{4}\ \frac{1}{4}\ \bar{z}; \frac{1}{4}\ \frac{3}{4}\ z; \frac{1}{4}\ \frac{3}{4}\ \bar{z}\ z = 0.088.$

From intensity calculations it was found that Ca in $\text{CaBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ and Sr, Ba and K in the corresponding compounds are probably situated in the position 000. The proposed structure is built up of $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2-}$ layers alternating with single perovskite layers. The resemblance to the structure of beyerite is pointed out.

I wish to thank Professor L. G. SILLÉN for valuable discussions concerning this work.

Stockholms Högskola, Institute of Inorganic and Physical Chemistry, June 1949.

REFERENCES. 1. *Internationale Tabellen zur Bestimmung von Kristallstrukturen*, Berlin 1935. — 2. Wells, A. F. *Z. Krist.* 96, 451, 1937. — 3. Stillwell, Ch. *Crystal Chemistry*, New York and London, 1938, p. 272. — 4. Lagercrantz, Å. and Sillén, L. G. *Arkiv Kemi etc.* 25, No 20, 1948.

Tryckt den 31 december 1949

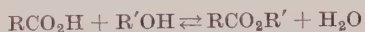
Uppsala 1949. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

On the synthesis of esters of some organic acids

By ARNE BRÄNDSTRÖM

With 1 figure in the text

In the last few years an azeotropic method for removal of the water formed in the direct esterification of an organic acid with an alcohol according to the formula:



has been used in this laboratory with excellent results. To a mixture of the alcohol and the acid there was added a solvent forming an azeotropic mixture with the water or with the alcohol and the water. After the addition of a little sulphuric acid as a catalyst, the mixture was refluxed under a constant water separator so arranged that the water formed in the reaction was continuously removed and the solvent returned to the reaction mixture.

Many kinds of water separators are described in the literature. The best known is probably that of DEAN and STARK (1) but it can not be used if a solvent heavier than water is employed. Another type has been described (2) which can be used for solvents both heavier and lighter than water, but this type is rather ungainly. In the following experiments, however, the water separator recently described by WIDEQVIST (3) was used (Fig. 1). For solvents heavier than water it was used with the inner tube A and with solvents lighter than water without it. In reactions with 0.1 mole of the acid a separator of 5 cc. capacity was used, in larger runs one of 50 cc. capacity.

Most acids are rapidly esterified with excellent yields by this method. However, esterification fails for certain substituted benzoic acids e. g. *o*-chlorobenzoic acid.

The method is useful not only in preparing ethyl esters, but also for the synthesis of esters of primary and secondary alcohols with the exception of methanol (4). Tertiary alcohols, however, are dehydrated, and no esters could be obtained from these. As some alcohol is removed with the water, somewhat more than the theoretical amounts must be taken. The following quantities for one equivalent of the acid have been found to be sufficient with benzene as the solvent: Ethyl alcohol (95 per cent) 100 g *iso*-propyl alcohol 80 g, *n*-propyl alcohol 70 g,

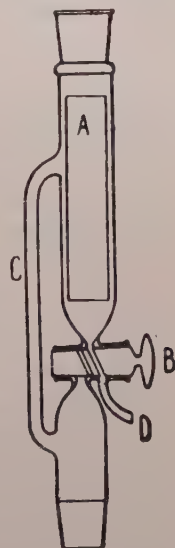


Fig. 1. The water separator,

iso-butyl, *n*-butyl and *sec*-butyl alcohol 76 g and of higher alcohols the theoretical amounts. With chloroform as the solvent about 80 g of ethyl alcohol (95 per cent) was used. If the acid contains water of crystallisation about 25 cc. more of ethyl alcohol was taken per mole of water.

Experimental

Chloroform as the solvent

Ethyl propionate: A mixture of 148 g of propionic acid (2 moles), 200 cc. of alcohol, 100 cc. of chloroform and 5 cc. of concentrated sulphuric acid was boiled in a 1—l. round bottomed flask, fitted with a reflux condenser and the water separator with the inner tube, until no more water separated. About 60 cc. of water had collected in the separator. The time required was about 4 hours. After cooling the mixture was washed with cold water, then with cold diluted sodium carbonate solution, and finally with water, and then dried with anhydrous sodium sulphate. The solution was then distilled through a fractionating column. The fraction boiling at 97—98° amounting to 189 g (92.5 %) was collected as pure ethyl propionate.

By this method *ethyl isobutyrate* b. p. 109—110° was prepared in 89 per cent yield.

Benzene as the solvent

Ethyl phenylacetate: A mixture of 272 g of phenylacetic acid (2 moles) 250 cc. of alcohol, 200 cc. of benzene and 5 cc. of concentrated sulphuric acid was boiled in the same apparatus as above, with the exception that the inner tube of the water separator was omitted, until no more water separated. About 120 cc. of water had collected in the separator, and the time required for this was about 3 hours. The product was worked up as above. The benzene was removed by distillation and the residue fractionated under reduced pressure. B. p. 112—113°/15 mm. Yield 315 g (96 %).

The following esterifications by this method may be mentioned.

Size of run	Acid	Alcohol	B. p. of ester	Yield
3 moles	<i>n</i> -Butyric	Ethyl	120°	87 %
0.5 mole	<i>n</i> -Valeric	»	144°	90 »
0.5 »	<i>iso</i> -Valeric	»	133°	88 »
0.5 »	Pivalic	»	117—118°	91 »
0.5 »	Heptoic	»	78°/14 mm	93 »
1.5 moles	Capric	»	122—124°/13 mm	94 »
1 mole	Ethoxyacetic	»	156°	88 »
0.3 »	Hexahydrobenzoic	»	80—81°/11 mm	94 »
0.5 »	β -Phenylpropionic	»	126°/15 mm	89 »
0.1 »	<i>m</i> -Nitrobenzoic	»	156°/10 mm	83 »
2.0 moles	Oxalic dihydrate	»	84—86°/11 mm	85 »
0.5 mole	Adipic	»	130°/14 mm	98 »
0.5 »	<i>n</i> -Butyric	<i>n</i> -Propyl	142.5°	87 »
0.1 »	<i>dl</i> -Mandelic	»	146°/12 mm	87 »
0.5 »	Adipic	»	150—151°/11 mm	96 »
0.5 »	Adipic	<i>iso</i> -Propyl	136°/14 mm	96 »
0.5 »	<i>n</i> -Butyric	<i>n</i> -Butyl	164—165°	88 »

Size of run	Acid	Alcohol	B. p. of ester	Yield
0.5 mole	Benzoic	<i>n</i> -Butyl	126.5°/14 mm	85 %
0.5 »	Adipic	»	165°/9 mm	89 »
0.5 »	<i>n</i> -Butyric	<i>iso</i> -Butyl	156.5°	86 »
0.1 »	Cinnamic	»	156—158°/10 mm	70 »
0.5 »	<i>n</i> -Butyric	<i>sec</i> -Butyl	151.5°	77 »
0.5 »	Adipic	»	153—154°/10 mm	78 »
0.5 »	<i>n</i> -Butyric	<i>n</i> -Amyl	78—80°/18 mm	92 »
0.5 »	Crotonic	»	85.5—86.5°/14 mm	80 »
0.5 »	<i>n</i> -Butyric	<i>iso</i> -Amyl	65—68°/12 mm	91 »
0.5 »	Benzoic	»	129°/12 mm	80 »
0.5 »	<i>n</i> -Butyric	Cyclohexyl	86—89°/10 mm	87 »

SUMMARY

Attention is called to the usefulness of a recently described water separator (3) in the preparation of esters of organic acids.

Department of Organic Chemistry, Chemical Institute, University of Uppsala, November 1949.

REFERENCES. 1. E. W. Dean and D. D. Stark, Ind. Eng. Chem. 12, 486 (1920). — Org. Syntheses 23, 38 (1943). — 2. Org. Syntheses I, 262 (1941). — 3. S. Wideqvist, Acta Chemica Scandinavica 3, 303 (1949). — 4. R. O. Clinton and C. S. Laskowski, J. Am. Chem. Soc. 70, 3135 (1948).

Tryckt den 10 januari 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Aktivatoren und Inhibitoren der Entwicklung pflanzlicher und tierischer Zellen

Von HANS VON EULER

GABRIEL BERTRAND hat in einer langen Reihe fundamentaler analytischer Arbeiten die Bedeutung gewisser Metallspuren betont und bewiesen.¹ Er hat nicht nur gezeigt, dass Pflanzen und tierische Organe ausser Eisen auch noch Zn, Cu, Mn, Ni, Co u. a. enthalten, sondern auch dass Tiere — er hat in der Regel seine Versuche mit weissen Mäusen ausgeführt — nach Entzug eines dieser Stoffe aus ihrer Nahrung ihre natürliche Gewichtszunahme und ihr Wachstum nicht aufrechterhalten können, sondern an Gewicht verlieren.

Als die ersten Ergebnisse von BERTRAND über die Lebenswichtigkeit der Oligo-Metalle erschienen, waren die biochemischen und besonders die enzymchemischen Voraussetzungen für das Verständnis dieser Tatsachen noch nicht gegeben, und so fanden dieselben die ihrer Wichtigkeit entsprechende Beachtung erst spät, und zwar hauptsächlich im Zusammenhang mit der Aufklärung der enzymatisch wirksamen Metallproteide. Hier ist besonders zu erinnern an die von KUBOWITZ² sowie von KEILIN und MANN³ entdeckten Cu-Proteide sowie an die von diesen Forschern⁴ als Zn-Proteid erkannte Kohlensäure-Anhydratase von MELDRUM und ROUGHTON.

Auch dem schon 1923 von BERTRAND und MITARB.⁵ betonten Anteil des Kobalts an Lebensvorgängen wurde — mit wenigen Ausnahmen — erst im letzten Jahrzehnt erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet⁶, als man den Zusammenhang der Wirkungen der Leber mit ihrem Co-Gehalt eingehend zu studieren begann⁷, und den Co-Gehalt des Vitamins B₁₂ erkannte.⁸

Über Reaktionen, in welche Co, ev. ein Co-Proteid, eingreift, ist noch wenig bekannt. Von erheblichem Interesse ist eine eingehende Untersuchungsreihe von

¹ Literatur: Siehe die Festschrift: Jubilé Scientifique de M. Gabriel Bertrand 24 Juin 1938; Paris 1938.

² KUBOWITZ, *Biochem. Z.* 292, 221 (1937). — 296, 443 (1938).

³ KEILIN u. MANN, *Proc. Roy. Soc. B* 125, 187 (1938). — *Nature*, 142, 148 (1938).

⁴ KEILIN u. MANN, *Biochem. J.* 34, 1163 (1940).

⁵ G. BERTRAND und MOKRAGNATZ *Bull. Soc. Chim.* 31, 1330 u. 1632 (1922); 37, 554 (1925). — G. BERTRAND und M. MACHEBOEUF *C. r. Acad. Sci.* 170, 1380 u. 1993 (1925) — G. BERTRAND, *Science*, 64, 629 (1926). — G. BERTRAND und H. NAKAMURA, *Ann. Inst. Pasteur*, 53, 371 (1934).

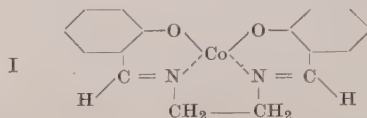
⁶ F. CAUJOLLE, *Exp. Ann. Biochimie Méd.* 7, 199 (1947).

⁷ A. ASCHKENASY, *Exp. Ann. Biochimie Méd.* 10, 309 (1949).

⁸ E. L. RICKES et al., *Science* 108, 634 (1948).

M. CALVIN und MITARB.¹ über synthetische Chelat-Verbindungen des Co. Kobaltkomplexe waren bekanntlich die ersten Modellsubstanzen für Chelate (P. PFEIFFER, Ann. 503; 1933), in denen also das Co nach dem Schema $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Co} \\ \diagdown \end{array}$ gebunden ist. Durch die Chelatbindung sind die Eigenschaften der gebundenen Metallatome wesentlich modifiziert.

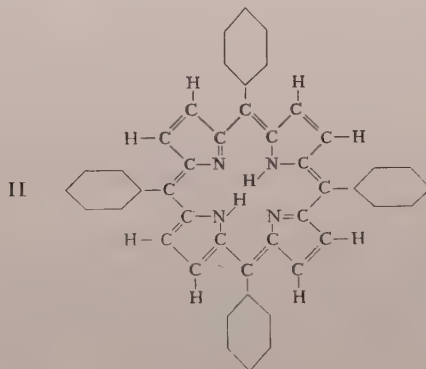
Die von CALVIN u. MITARB. studierten Co-Chelate vom Typus I



(dargestellt aus Co, Salicylaldehyd und Äthylendiamin) absorbieren O_2 aus der Luft unter Bildung von Peroxyden.

Eine ähnliche Chelat-Bildung liegt vor in den von BURK² sowie von HEARON beschriebenen Verbindungen von Co mit Histidin (Cancer Res. 9, 1 (1948)).

Die biologische Rolle des Co mag also, wenigstens teilweise, an die Sauerstoff-Übertragung solcher Chelate geknüpft sein. Durch die Fähigkeit zu Chelatbildungen kann also eine gewisse, in manchen Organen wie z. B. Leber auftretende Spezifität zustandekommen.³



Durch Co-Salze werden auch Nukleinsäuren gefällt, wenn auch in geringerem Grade als durch Streptomycin. Die Co-Wirkung erstreckt sich auf Nukleoproteide und, wie man annehmen darf, auch auf die granulären Elemente des Plasmas.

Streptomycin (STRM) ruft nach unseren Befunden³ schon in geringer Konzentration eine Hemmung der Chlorophyllbildung bei der Keimung hervor.

¹ M. CALVIN u. MITARB., J. Am. Chem. Soc. 68, 2254—78 (1946).

² BURK u. MITARB., Cancer Research 6, 497 (1946).

³ Von dem unten besprochenen Gesichtspunkt der Antichlorophyllwirkung aus ist es von Interesse, dass die Bildung einiger *Porphin-ähnlicher* Produkte aus Benzaldehyd, Pyrrol und Pyridin (Formel II) durch Zn-Acetat stark katalysiert wird. (R. H. BALL, G. D. DOROUGH and M. CALVIN, J. Am. Chem. Soc. 68, 2278 (1946)).

I. Serie a. (Temperatur 17°.)

Es wurde also der Einfluss kleiner Co-Salzmengen auf die Keimung von Samen, und zwar zunächst auf die Keimung von Gerste und Kresse untersucht. Dabei wurde in Betracht gezogen, dass eine dem STRM-Effekt analoge Antichlorophyll-Wirkung mit Stoffen erreicht werden kann, die, wie Co, gewisse Mitochondrien (und zwar ev. durch Einwirkung auf die Phosphatasen und Adenosintriphosphatase derselben) angreifen, im übrigen aber keine toxischen Wirkungen auf die in der Entwicklung befindlichen Zellen ausüben.

Mit Kobaltsalzen wurde der gesuchte Effekt an den bisher am meisten bearbeiteten Samen von Gerste und Kresse entweder gar nicht (Gerste) oder nur unvollständig (Kresse) erreicht. Wir beschreiben den mit Kresse angestellten Versuch:

In 0,004 mol. Kobaltchlorid-Lösung werden Kressen-Samen (*Lepidium sativum*) 24 Stunden lang gequollen. Dann werden die Samen in mit Filterpapier bedeckte Schalen übergeführt, die mit der gleichen Kobaltsalzlösung befeuchtet sind. Nach 6 Tagen ist die Keimung (im Vergleich mit derjenigen in Wasser) nur wenig fortgeschritten; auffallend sind die minimalen Wurzeln und die dunkelbraune Farbe der Samenhülsen. Die ersten Blätter entwickelten sich während 5 bis 6 Tagen; dieselben sind aber nicht grün sondern nur gelb. Die mikroskopische Untersuchung ergab eine sehr geringe Anzahl Chloroplasten, im übrigen degenerierte Plastid-Formen. Nach weiteren 4 Tagen zeigen die Blätter eine gelbbraune Farbe, unveränderte Chloroplasten sind kaum mehr bemerkbar. Die allgemeine Entwicklung ist stark zurückgeblieben; wegen der geringen Ausbildung der Wurzeln können die Pflänzchen nicht aufrecht stehen.

Auch bei der Quellung in 0,002 mol. CoCl_2 -Lösung und nachheriger Überführung in Schalen mit der gleichen Kobaltsalzlösung verläuft die Keimung sehr langsam. Die Samenhülsen färben sich dunkelbraun, die Wurzeln sind nach 6 Tagen nicht länger als 2–5 mm. Die Stengellänge beträgt nach dieser Zeit 4–7 mm. Die Blätter sind hellgrün. Die mikroskopische Untersuchung ergibt eine unternormale Chloroplasten-Zahl.

Erst nach der Quellung in 0,0005 mol. Lösung zeigen die Blätter nach 6 Tagen die normale grüne Farbe. Die Wurzeln, 10–18 mm, haften nach 6 Tagen am Filtrierpapier. Stengel 15–18 mm.

Quellung in Leitungswasser: Nach 6 Tagen beträgt die Wurzel-Länge 20–40 mm; Stengel etwa 15 mm; Samenhülsen hellbraun.

Nach Quellung und Keimung in 0,0001 bis 0,0002 mol. Co-Salzlösung wurde eine *geringe Beschleunigung* der Keimung und der darauf folgenden Entwicklung beobachtet.

II. Serie b. (Zimmertemperatur 20°.)

Quellung und Keimung in 0,004 mol. Kobaltnitrat. Nach 4 Tagen nur sehr geringe Anzeichen einer Wurzelbildung. Nach 8 Tagen 3–5 mm lange braungraue Würzelchen in Klauenform. Keimling 30–40 mm. Nach 11 Tagen sehr hellgrüne Blätter; etwa die halbe normale Chloroplasten-Zahl.

Quellung in 0,01 mol. Kobaltnitratlösung: Nach 7 Tagen überhaupt keine Keimung. In dieser Lösung wurde nach 8 Tagen Spontan-Infektion und Wachstum von *Penicillium* sehr deutlich.¹

¹ In diesem Zusammenhang seien Beobachtungen kurz erwähnt, welche die starken antibiotischen Wirkungen keimender Kressensamen und — in noch höherem Grad keimender

Quellung in 0,002 mol. Kobaltnitratlösung: Nach 6 Tagen: Hülsen hellbraun. Wurzeln 20–40 mm. Stengel 15 mm. Blätter normal grün. Wenig Unterschied gegenüber Quellung in Wasser.

Versuche mit Dimethylglyoxim

Kressensamen. Dimethylglyoxim ist bekanntlich ein Fällungsmittel für Co wie für Ni. Es wurden Keimungsversuche mit gesättigten Dimethylglyoxim-Lösungen an Kresse und an Gerste angestellt, in der Erwägung, dass hierdurch die natürliche Co-Konzentration der Samen erniedrigt werden könnte.

Die Effekte waren gering: An Kresse wurde innerhalb 3 Wochen eine kleine Verzögerung der Keimung festgestellt; die Wurzellänge war dann etwa 50 mm (gegen etwa 100 mm normal), die Stengel waren etwa 35 mm hoch (gegen etwa 50 mm normal). Bezgl. der grünen Farbe der Blätter und der Zahl Chloroplasten war kein Unterschied gegenüber den in Wasser gekeimten Pflanzen zu bemerken.

Kobalt-Komplex-Wirkungen auf grüne Pflanzen

Junge Schösslinge aus Impatiens balsamica. Es sollte festgestellt werden, ob die an den Schösslingen auftretenden jungen Blätter durch Co-Komplexe chlorophyllarm werden. Schösslinge von 4 etwa 40 cm hohen Pflanzen wurden abgeschnitten und zunächst in verdünnter Nährlösung zur Entwicklung von Wurzeln gebracht, was etwa 10 Tage erforderte. Die Schösslinge mit ihren 10–40 mm langen Wurzeln wurden dann in Nährlösungen übergeführt, welche die Chlorophyllbildung hemmende Substanz enthielt.

In 0,002 mol. STRM-Lösung wurde der Chloroplasten-Gehalt der wachsenden *Impatiens*-Blätter unbedeutend (ca 15 %) vermindert.

Im Anschluss an die oben erwähnten Ergebnisse von CALVIN u. MITARB. und an die Versuche von BURK (l. c.) haben wir auch Keimungsversuche mit Kobaltsalzlösungen unter Zusatz von *Histidin* angestellt. Unsere Resultate sind im Wesentlichen in Übereinstimmung mit vorhergehenden: wir erhalten eine Umkehrung der Kobalt-Wirkungen durch Histidin sowohl bei der Keimung von Kresse als bei der Wurzelentwicklung aus *Impatiens*:

0,004 mol. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung durch Zusatz von Histidin-Hydrochlorid auch 0,004 mol. an diesem Salz. Acidität $\text{pH} = 6,9$:

Nach Quellung und 6-tägiger Keimung analog der S. 487 beschriebenen, sind die Kressenblätter fast normal grün, Wurzeln deutlich verkürzt, Länge der Stengel etwa 20 % geringer als nach Keimung in Wasser.

Wurzel-Entwicklung: 4 *Impatiens*-Schösslinge mit ca 15 mm langen Wurzeln wurden in etwa 10 mm weite, 80 mm lange Glasrören übergeführt, welche Nährlösungen mit CoCl_2 -Zusätzen der Molaritäten 0,02, 0,01, 0,005 und 0,003 ent-

Gerstensamen zeigen. Wir haben im Lauf der letzten Jahre häufig solche Beobachtungen gemacht und auf Grund derselben auch systematische Versuche angestellt, in welchen keimende Samen von Gerste, Roggen, Phleum pratense und Lepidium sativum mit reinen Stämmen von *Aspergillus niger* — wir verdanken dieselben Herrn Professor Dr. Harry Lundin, Technische Hochschule Stockholm — und mit *Escherichia Coli* vom Bakteriologischen Laboratorium des Staates, geimpft wurden. Die Versuche werden an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt.

hielten. Durch die beiden stärksten Co-Zusätze welkten die Blätter der Schösslinge in etwa 1 Woche; neue Blätter traten nicht auf.

Chlorophylldefekte wurden auch durch die schwächeren Co-Konzentrationen an *Impatiens* nicht erzeugt, hingegen bei 0,001 Mol. sehr starke Hemmungen des Wurzelwachstums. Auf diese Hemmungen der Zellteilung, die durch Histidin, Glutaminsäure sowie Ribonukleinsäure teilweise aufgehoben werden, hoffen wir bald zurückzukommen.

Unsere Versuche über die Antichlorophyll-Wirkung von Kobaltsalzen werden fortgesetzt, da auch die Versuche von CALVIN¹ über Porphin-Synthese für unsere Annahme sprechen, dass Co in die Bildung des Porphyrinkomplexes eingreift, besonders da CALVIN auch Komplexe mit Hämoglobin und Hämocyanin erwähnt.

EULER, BRACCO und HELLER² haben in früheren Mitteilungen die Unterdrückung der Chlorophyllbildung in keimenden Samen auf den Einfluss zurückgeführt, welchen Streptomycin (STRM) auf die Chondriosomen (Mitochondrien) des Cytoplasmas ausübt.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Chloroplasten, wie auch das Chloroplastin von STOLL³, von Kobaltilösungen gefällt wird (Arkiv 1, 31).

Da es nahe liegt, die Hemmungswirkungen der Kobaltsalze auf Hemmungen ihrer Enzymsysteme zurückzuführen, haben wir den Einfluss geringer Co-Konzentrationen auf Katalase-haltige Extrakte untersucht, und zwar zunächst auf die Katalase-reichen Extrakte der Ratten-Leber (A. GLASER).

Wie an anderer Stelle ausführlicher mitgeteilt wird, wurde Kat.f von Leberextrakten durch eine CoCl_2 -Konz. von $5 \cdot 10^{-4}$ im Verhältnis rund 1 : 0,4 erniedrigt.

Da diese Bestimmungen durch Titration mit Kaliumpermanganat ausgeführt wurden, haben wir zunächst festgestellt, in welchem Grad H_2O_2 durch Kobaltsalze ohne Mitwirkung von Katalase zerlegt wird. Zu 5 ml 0,5 %iger Kobaltnitrat-Lös. wurden 5 ml 0,015-n. H_2O_2 -Lösung und hierauf unmittelbar 1 ml 4-n. Schwefelsäure zugesetzt, worauf sofort mit einer 0,01 n KMnO_4 -Lös. titriert wurde. Verbrauch 13,5 ml. (R. BODECK).

In einem analogen Versuch stand die Reaktionslösung 24 Minuten bei 0° ; erst dann erfolgte der Zusatz der Schwefelsäure, der Verbrauch an Permanganat betrug 12,4 ml. Die durch Co katalysierte Zersetzung des H_2O_2 entsprach 1,1 ml der 0,01 n. Permanganat-Lös.

Den mit Kobaltsalzen, wie früher mit STRM angestellten Versuchen zufolge sind Nukleoproteide, wahrscheinlich auch die Nukleinsäuren selbst, in einem gewissen Stadium der Zellentwicklung besonders empfindlich. Wie wir schon früher betont haben⁴, liegt hier eine deutliche Analogie vor zu der besonderen Empfindlichkeit der Nukleoproteide bei gewissen Entwicklungsphasen gegen Röntgenstrahlen.

Genetische Problemstellungen

In einer vorhergehenden Mitteilung haben wir einige Versuche erwähnt, welche wir an chlorophylldefekten Mutanten vom Albina 1-Typ NILSSON-EHLE's mit

¹ M. CALVIN u. MITARB., J. Am. Chem. Soc. 68, 2278 (1946).

² EULER, M. BRACCO und L. HELLER, C. r. Acad. Sci. Paris, 227, 16 (1948).

³ A. STOLL, X. Congr. Intern. di Chimica. Roma 1938, 206.

⁴ EULER, Kem. Arbeten Bd 12, juli 1949.

STRM angestellt haben. Auch andere Versuche¹ sind auf die Vererbbarkeit chemisch induzierter Chlorophylldefekte gerichtet.

In Zusammenhang mit den mit M. BRACCO und L. HELLER ausgeführten Versuchen mit Chondriosomen und Mitochondrien konzentrieren sich unsere weiteren Arbeiten auf die Frage nach der *plasmatischen Vererbung* (WETTSTEIN) *der chemisch induzierten Chlorophylldefekte*.

Bei Gerste kann man durch richtige Wahl der STRM-Konzentration bei der Samenkeimung in einer Ausbeute von 50–75 % Pflanzen erhalten, welche bei verändertem Chlorophyllgehalt noch voll entwickelt, d. h. bis zur Reife gebracht werden können. Leider war das aus dieser Generation erhaltene Körner-Material zu klein, so dass aus weissen Nachkommen noch keine Schlüsse gezogen werden können.

Auf die Bedeutung einer exakten Durchführung solcher Versuche braucht hier nicht eingegangen zu werden. Es sei nur auf die in den letzten Jahren von P. MICHAELIS², von H. ROSS³, von H. NOTHDURFT⁴ sowie von H. WEYLAND⁵ mitgeteilten Versuche und die daran geknüpften Schlussfolgerungen hingewiesen.

Tierversuche mit Kobaltchlorid

Die Lebensnotwendigkeit des Co für Tiere ist, wie eingangs erwähnt, bereits von G. BERTRAND mit MACHEBOEUF, NAKAMURA u. a. gezeigt worden.

Eine Zusammenstellung der Literatur über die Biochemie des Kobalts, die auch eine Übersicht über den Einfluss dieses Metalls auf enzymatische Reaktionen enthält, liegt von CAUJOLLE vor und umfasst die Arbeiten bis 1946.

Die grosse Bedeutung dieses Oligo-Elementes scheint in dessen blutbildender Wirkung zu liegen. Was bis 1948 darüber bekannt war, hat A. ASCHKENASY in einer Monographie⁶ zusammengestellt. In einem Vortrag von T. THUNBERG⁷ findet man weitere interessante Literatur-Angaben über Kobalt-Effekte.

Wachstum

In orientierenden Versuchen (März bis Mai 1949; G. Lindeman) erhielten junge, ca 30 g schwere Normalratten 100 γ CoCl₂ per Tier und Woche. Die Gewichtszunahme betrug bei

4 Versuchstieren im Mittel	2,67 g per Tier und Tag
4 Kontrolltieren » »	2,61 g » » » »

Ein orientierender Versuch mit Vitamin-A-freien Ratten die zu der Diät S II + D noch täglich 1,5 I. E. β Carotin erhielten, ergab bei Zusatz von 100 γ CoCl₂ Gewichtszunahme per Tier und Woche:

3 Versuchstiere im Mittel . . .	0,99 g
3 Kontrolltiere » » . . .	0,96 g

¹ EULER, Dieses Arkiv 26 A No 30 (1949).

² P. MICHAELIS, Naturwiss. 34, 18 (1947). — Z. Naturf. 3 b, 196 (1948). Biol. Zbt. 67, 32 (1948). — Z. Vererbungslehre 82, 197 (1948).

³ H. ROSS, Naturwiss. 33, 316 (1947).

⁴ H. NOTHDURFT, Z. f. Krebsforsch. 56, 176 (1948).

⁵ H. WEYLAND, Z. f. Krebsforsch. 56, 148 (1948).

⁶ A. ASCHKENASY, Exposés Ann. de Biochimie Méd. X. Série. 1949.

⁷ T. THUNBERG, K. Fysiogr. Sällskapets i Lund Förh. 19, Nr 16 (1949).

Ein Einfluss auf die Gewichtszunahme machte sich also nicht bemerkbar.

Die Co-Gaben lagen noch erheblich unterhalb der toxischen Dosen (Le Goff). Da aber mit solchen Dosen schon von PITTINI und MESSINA (1899) Zunahme von Hämoglobin beobachtet worden war, haben wir in einer neuen Versuchsserie (G. LINDEMAN) Kobaltchlorid-Dosen von ca 500 γ per Tier und Woche mit dem Trinkwasser verabreicht, und zwar während einer Versuchszeit von 4 Wochen. Als Resultat kann die mittlere Gewichtszunahme per Tier und Tag angegeben werden:

Versuchstiere (Co-Zusatz)	2,0 g
Kontrolltiere	1,85 g

Entwicklung von Sarkomen

An Ratten, welche Benzpyren-Sarkome trugen, hatte sich in orientierenden Versuchen keine hemmende Co-Wirkung gezeigt (LINDEMAN). Wir haben diese Versuche wiederholt, teilweise auf Grund der Angaben von BURK, M. L. HESSELBACH, CL. FISCHER, J. HEARON und A. SCHADE.¹ Diese Forscher berichten über Hemmungen des Wachstums spontaner Mamma-Adenocarcinome sowie von Adenocarcinomen in Herz und Brust bei Mäusen.

An Jensen-Sarkom tragenden Ratten haben wir teils CoCl_2 durch das Trinkwasser verabreicht, teils in Dosen von 500 γ per Woche injiziert. Rückgang der Sarkome trat *nur* unter Mitwirkung von *Histidin* ein.

Katalase-Wirkung der Leber. Durch intramuskuläre Injektion von 2 mal 100 γ Co⁺⁺ sinkt nach Versuchen von A. GLASER Kat.f der Leber halbjähriger Ratten im Mittel von 550 auf 100. Auch bei Sarkomratten nimmt Kat.f der Leber durch Co-Injektion erheblich ab.

Vergleichende Versuche an Pflanzen und an Tumor-tragenden Ratten

Solche Vergleiche bezgl. der Einwirkung verschiedener chemischer Stoffe sind in unserem Arbeitskreis wiederholt und von verschiedenen Ausgangspunkten angestellt und diskutiert worden², und zwar schon mehrere Jahre, bevor wir somatische Veränderungen bei Einwirkung chemischer Stoffe auf pflanzliche und tierische Gewebe in Betracht zogen. Die Entstehung chlorophylldefekter Gersten-Mutanten scheint ein zwar noch sehr komplexer aber doch verhältnismässig durchsichtiger Vorgang zu sein, und der Einfluss von einerseits Streptomycin, andererseits von Röntgenstrahlen scheint uns eine Reihe von Vergleichsmöglichkeiten zu bieten.

Während wir bei dem genetisch definierten Auftreten von chlorophylldefekten Mutanten, z. B. Gerstenmutanten, die sich ändernde Eigenschaft quantitativ erfassen können, und in der Tatsache, dass sich der Katalase-Gehalt bzw. die Katalase-Wirkung stets gleichzeitig mit dem Chlorophyllgehalt ändert einen wertvollen chemischen Anhaltspunkt besitzen, haben wir von der "Mutation"

¹ D. BURK, M. L. HESSELBACH, CL. FISCHER, J. HEARON and A. L. SCHADE, Cancer Research. 6, 497 (1946). — 9, 1 (1949).

² EULER u. PERJE, Dieses Arkiv 20 A No 2 (1945). — EULER, Veröff. dtsch. wiss. Inst. Stockholm Nr 2 (1945). — EULER u. SKARZYNSKI, Biochemie der Tumoren. Stuttgart, Enke 1942.

von plasmatischen oder Kern-Veränderungen der normalen tierischen Zelle zur Krebszelle noch keine biochemisch greifbaren Vorstellungen, und wir sind, um den schwankenden Begriff der cancerösen Mutation zu festigen, zunächst wie auch H. WEYLAND¹ betont, auf Vergleiche mit den durch ähnliche chemische Reize hervorrufbaren Vorgänge angewiesen. Besonders werden für das Studium der somatischen und der Kern-Veränderungen die Wirkungen der Röntgenstrahlen und die Teilnahme der Nukleoproteide in Betracht zu ziehen sein.

Stockholm, Universität, Vitamin-Institut.

Tryckt den 10 januari 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Development of benzpyrene sarcoma and Jensen sarcoma grafted on rat brains and their influence on the pyruvic acid content of the blood

By FRANCO SOAVE

As it results from research work carried out by SZENT GYÖRGYI, PETERS, KREBS, MARTIUS, LIPMANN and others, pyruvic acid acts as an important intermediate substance between carbohydrates and aminoacids in the animal body.

Concentration of pyruvic acid in the blood is partly regulated by production of this substance from carbohydrates and other food components, and partly by consumption of pyruvic acid due to further organic oxidising and reducing reactions.

The role played by aneurine (Vitamin B₁) in pyruvic acid metabolism is remarkable owing to the fact that carboxylase reacts through co-carboxylase¹, which LOHMANN² has identified with aneurinpyrophosphate.

A. KREBS, R. A. PETERS and P. E. SIMOLA³ have made interesting contributions to the mechanism of co-carboxylase in relation to avitaminosis B₁. In animal bodies co-carboxylase is connected with apo-enzyme (GREEN's apo-carboxylase II) different from that in the yeast. For the problem to be examined it is remarkable, that the degradation of pyruvic acid in the brain and nerves is inhibited by the deficiency of aneurine (R. PETERS⁴; P. E. SIMOLA; F. CEDRANGOLO⁵). The percentage of pyruvic acid in the blood is not merely regulated by the carboxylase system in a restricted sense, but is also influenced by the body temperature, by muscular activity and especially by several organic hormones and by vitamins; the influence of insulin and adrenalin⁶ has been discovered prior to that of sexual hormones.⁷

The influence of sarcomas grafted on rats, mice and rabbits on the percentage of pyruvic acid in the blood is fully proved; such influence is dependent on the size of the sarcoma. The following table (p. 494) shows the influence⁸ exercised by Jensen sarcoma.

Jensen sarcoma in tested rats has been obtained by subcutaneous grafts on the back side area.

¹ E. AUHAGEN, Z. physiol. Chem. 204, 149 (1932). — Biochem. Z. 258, 330 (1933).

² K. LOHMANN and P. SCHUSTER, Biochem. Z. 294, 188 (1937).

³ P. E. SIMOLA, Biochem. Z. 254, 229 (1932). — Z. physiol. Chem. 278, 57 (1943).

⁴ S. OCHOA and R. A. PETERS, Biochem. J. 32, 1501 (1948).

⁵ F. CEDRANGOLO, Archiv. di Sc. Biologiche, 26, 89 (1940), see also R. H. S. THOMPSON and R. E. JOHNSON, Biochem. J. 29, 694 (1935).

⁶ G. NYLIN, H. v. EULER and HÖGBERG, Klin. Wochschr. 19, 433 (1940).

⁷ H. v. EULER, I. SÄBERG, B. v. EULER and B. HÖGBERG, Z. physiol. Chem. 268, 171 a. 235 (1941). — 270, 125 (1941).

⁸ H. v. EULER, L. AHLSTRÖM, I. RÖNNSTAM, I. PETTERSSON, Z. f. Krebsforsch. 55, 15 (1944).

Weight of sarcoma	γ of PA per ml of blood average values
0 normal rat	13
0—10 g.....	28.5
10—20 g.....	35.0
20—30 g.....	39.8

Investigation of the action of sarcoma grafted on the brain is therefore of particular interest.

So far there is a considerable scarcity of data referring to the behaviour of grafts of the Jensen's sarcoma type and therefore the Experiments published hitherto show considerable variations.¹ The development of benzpyrene and methyleholanthrene sarcomas in the brain of rats has often been investigated, but even in such cases no care has been taken to record their influence on the general metabolism and more particularly on pyruvic acid.

Sexual hormones of embryonal gland and superior hormones of the hypophysis having a great influence on metabolism of carbohydrates, an investigation seemed to be of interest concerning the problem, which effect tumours, growing in brain have on the PA-content of the blood.

Unfortunately present researches have been interrupted when only a limited number of rats with graftings of the above sarcomas had been examined; these successful grafts may be considered as the starting point for further research work and I therefore consider it useful to describe them.

The first studies on this matter were those of DA FANO³, who operated intracerebral transplantations of different strains of tumors in rats, mice and dogs. At a later date, EBELING⁴, SHIRAI⁵, MURPHY and YAMAZAKI⁶ made successful inoculations in mice. Sturm was the first to suggest that positive results were due to the absence of a lymphocytic defensive reaction in the nervous system. MIWA and MATANO reported successful cerebral transplantation of heterologous tumors and confirmed the absence of a defensive reaction in the brain tissue.

CLAUDE on the contrary described the presence of lymphocytic infiltrates, macrophages, polyblastes, eosinophilia and microlia as early as the third day after the inoculation of mouse carcinoma 37 in a rat's brain. The majority of authors who have succeeded in accomplishing intracerebral tumor transplantations have ascribed the favorable condition for development of grafts, especially in the case of heterologous tumors or homologous tumors in refractory animals, to a characteristic of the brain not found in any other organic tissue, namely the absence of a mesenchymatous response, conditioned by the small numbers of cells of mesodermal type in the nervous tissue.

RIO-HORTEGA has discovered a new type of cells of mesodermal origin.

In case of tumors, as in traumatic lesions of the nervous system, HORTEGA-cells

¹ DA FANO cited by ILFELD, Am. Journ. of Cancer, 26, 743 (1936).

² OBERLING and coll. C. r. Soc. Biol. 123, 1152 (1936). — Athias, C. r. Soc. Biol. 126, 585 (1937).

³ C. D. DA FANO, Folia Neurobiologica 6, 109 (1912).

⁴ E. EBELING, Ztschr. f. Krebsforsch. 14, 151 (1914).

⁵ SHIRAI Y., Japan Med. World, v. 1. n 2, 14 (1921).

⁶ MURPHY and YAMAZAKI quoted by BAYLEY, Arch. Surg. 18. 1395 (1929).

rapidly assume a defensive activity. They are the representatives in the nervous tissue of several cell types of the reticulo-endothelial system, whose participation in antitumor defense is acknowledged and has been repeatedly studied.

The activity of 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene, methylcholantrene and 1, 2-benzpyrene in inducing malignant growths by cutaneous or subcutaneous application in experimental animals has by now been well established. ILFELD¹ inserted into the cerebral cortex of mice pellets of 5% dibenzanthracene-cholesterol with negative results after eight months. WEIL² has reached — at a later date — the same results and OBERLING, SANNIE and GUERIN³ got hypophyseal adenomas in 3 rats after injecting benzpyrene in brain.

BERTRAND and GRUNER⁴ injected benzpyrene intracerebrally into rabbits, no tumors were obtained in any of the animals by the end of a year, although granulomatous lesions were present in some cases.

Brain tumors have been produced in males by the intracerebral implantation of pellets of 20-methylcholanthrene by SELIGMAN and SHEAR⁵; of the 20 mice employed, 11 developed gliomas and 2 developed fibrosarcomas. One glioma and one fibrosarcoma were successfully transplanted. I have not been able to find out whether Jensen sarcoma has been transplanted as grafts in the rat's brain.

This work has been carried out at the Institute for Research in Organic Chemistry University of Stockholm, and I take this opportunity to express my sincere thanks to its Director Prof. H. v. EULER, for the facilities granted me in carrying out the experiments.

I have studied the evolution of benzpyrene carcinoma and Jensen sarcoma transplanted in rat's brain with the purpose of investigating the percentage of pyruvic acid (p. a.) in the sarcomatous animal's blood. The tumors employed were inoculated by graft and the inoculation was performed under light ether anaesthesia, a cutaneous incision being made and the bones perforated with small curved scissors. The tumor's graft was introduced in the rat's brain using curved and very thin pincers.

The spot chosen for inoculation was on the posterior parietal wall, 2 mm from the middle line, and at a depth of 3 mm. Such inoculation does not injure any important blood vessel.

In the two series of experiments pieces of tumors taken from animals killed immediately before transplantation, were inoculated in rat's brain. The histological observations were made upon material prepared with hematoxylin-eosin. The protocols for all rats are recorded in Table I and II.

Benzpyrene Carcinoma

In post mortem examination of the brain the parietal bones appear thin and were connected by a broad membrane, which appeared to be continuous with their periosteal linings. Through this membrane a portion of the tumor could be seen.

Generally at the histological examination the tumors were densely cellular with a moderate amount of stroma and some evidence of necrosis and perivascular he-

¹ F. W. ILFELD, *Am. J. of Cancer*, 26, 743 (1936).

² A. WEIL, *Arch. Path.* 26, 777 (1940).

³ OBERLING, C., GUERIN, C., and GUERIN, P., cited by SELIGMAN and SHEAR.

⁴ BERTRAND and GRUNER, cited by SHEAR, M. J., *Am. J. of Cancer* 36, 201 (1939).

⁵ A. SELIGMAN and J. SHEAR, *Am. J. of Cancer*, 37, 364 (1939).

Table I
Benzpyrene Carcinoma

This tumor has been transplanted 6 times; it has been obtained 8 months after injecting a suspension of benzpyrene.

Rats no.	Date of inoculation	Dead	Tumor age in days	Result	Observations	Piruvic Acid %
10576	17.2. 49	1.4. 49	43	+	Elongated tumor arising from the brain	17.3
10577	17.2. 49	17.3. 49	28	+	Tumor in the right hemisphere, spreading through the whole bony wall and subcutaneous tissue of the skull.	15.8
10578	17.2. 49	24.2. 49	7	—	Abscessus in the right hemisphere	11.7
10579	17.2. 49	1.4. 49	43	+ +	Tumor in the right hemisphere	19.5
10580	17.2. 49	2.3. 49	13	+	Tumor extending between the brain and subcut. tissue	23.7
10581	18.2. 49	19.3. 49	29	—	No tumor, microlia reaction quite strong	13.2
10582	18.2. 49	10.3. 49	20	+	Tumor in the right hemisphere	16.4
10583	18.2. 49	12.3. 49	22	+	Tumor in the right hemisphere	17.1
10584	17.2. 49	16.3. 49	27	+	Tumor extending between the brain and the subcut. tissue through the bony wall.	25.7

Table II
Jensen Sarcoma

This tumor has been transplanted 6 times.

Rats no.	Date of inoculation	Dead	Tumor age in days	Result	Observations	Piruvic Acid %
10622	16.3. 49	1.4. 49	16	+	Tumor in the left hemisphere	19.4
10623	19.3. 49	4.4. 49	16	—	No tumor	11.8
10624	16.3. 49	10.4. 49	25	+	Tumor in the right hemisphere	19.9
10625	16.3. 49	15.4. 49	30	—	No tumor	11.5
10626	18.3. 49	18.4. 49	31	+ +	Tumor arising from the brain stem and spreading through the right hemisphere to the bony wall	12.3
10627	19.3. 49	25.4. 49	37	—	No tumor	12.3
10641	29.3. 49	8.4. 49	10	+	Tumor in the middle line	19.5

morrhage particularly in necrotic regions. The cell nuclei were round, with several elongated forms, the nuclear chromatin was dense and mitoses were numerous.

There was microglial proliferation in the surrounding brain tissue and microglia cells were interspersed with the other neuroglial elements, but were most numerous in the perivascular spaces. The compressed and degenerated brain substance which lay adjacently to the tumors introduce a variety of cell reactions which slightly complicated the picture.

In the area of neuroglial reaction (peripheral zone) fibroplastic proliferation was seen in the outer layer of many of the vessel walls.

Jensen Sarcoma

In the cases of successful inoculation a typical Jensen sarcoma is present, the tumors were similar in histologic appearance. They can be considered as divided into three zones, central, middle and peripheral. The central was composed of a necrotic hemorrhagic material. The middle zone was made up of proliferating fibroblastic tissue and was very rich in cells. The peripheral zone of the tumor represented the neuroglial reaction to the invasion of the fibroblastic elements. Here there was gradual blending of the reactive into the normal brain substance, with no sign of capsule formation. The most characteristic part of each tumor was found in the middle zone, where one could study the variable structure of the proliferating tumor cells. The small spindle-shaped cells contained hyperchromatic nuclei. Mitotic figures were frequent in these areas.

Determination of pyruvic acid in the blood

The writer has used the Lu¹ method as modified by v. EULER-SCHLENK-HÖGBERG² in order to determinate the amount of PA in the blood's serum. The procedure is as follows:

The blood to be examined (quantities varying from 0.2 to 0.8) is quickly freed from proteins with trichloroacetic acid after the decapitation of the animal. The blood is then left at 0° for 10 minutes and subsequently centrifugated for 10 minutes.

The clear portion is sucked into a Thunberg tube and the PA contained in the serum is transformed into its corresponding dinitrophenylhydrazone, which is then extracted from the water solution with ethyl acetate. The excess of dinitrophenylhydrazone is removed and the reading is subsequently made — after adding an alcoholic solution of the photometer scale by using the small basin S 53 and the red screen. With the assistance of a curve previously prepared with a standard solution of PA (see Archiv för Kemi, Mineralogi och Geologi 13 B nr. 16; 1939).

It is known that Jensen sarcoma and Brown Pearce carcinoma when transplanted in the subcutaneous tissue of a rat cause metabolic alterations in the blood of animals (H. v. EULER, AHLSTRÖM, RÖNNESTAM-SÄBERG and PETTERSSON³).

In fact while the percentage of PA in the blood of normal rats is about 13 γ it rapidly increases to 20–45 if one of the mentioned tumors is transplanted in the subcutaneous tissue of the animal.

As the weight of the tumor in 2–3 weeks may vary from 10 to 30 gr., the PA reaches percentages varying between 100 and 300 % and for animals bearing large tumors the percentage may even be 4 times greater than normal. The behaviour is reported in the following Table:

Tumor	PA cc blood	Rel. increase
Jensensarcoma rats	30–50	2.3–3.8
Brown-Pearce carcinoma	about 40	1.6–2.0

In the last column of Tables I and II are reported percentages of PA obtained in my experiments.

¹ LU, Biochem J. 33, 249 (1939).

² v. EULER, SCHLENK, HÖGBERG, Uppsala Läkarefö. Förh. N. F. 45 (1939).

³ v. EULER, AHLSTRÖM, RÖNNESTAM-SÄBERG and PETTERSSON. Z. f. Krebsforsch. 55, 15 (1944). See also M. MICHAELIS, N. J. ARANGO and R. W. GERARD, Am. J. of Physiol. 157, 463 (1949).

In the rats treated with benzpyrene carcinoma grafts, the percentage of PA has slightly increased in comparison with normal rats: yet there is general parallelism but no proportionality between the size of the tumor and the percentage of PA, in accordance with the results obtained by v. EULER et al. (Z. f. Krebsf. 55. 15 (1944.)

In fact, in two cases of mine, the tumor which developed, weighed 6 gr, while the percentage of PA equalled normal rats: on the contrary from some animals with intracranial tumor slightly perceptible, possessing filtering and expansive developing tendencies, I have obtained rather high percentages (rats 10583 and 10584).

In rats treated with grafts of Jensen sarcoma the thriving of the tumor has been less noticeable than in previous sets and the development in size has been smaller. It is very interesting to note that in animals destroyed during the first 20 days of the experiment an increase of PA in the blood has been noticed with a much higher percentage than in animals destroyed after 15-25 days.

During an extensive research work on the influence of tumors on the PA concentration in the blood, the question has often been raised on the origin of this extraordinary large effect; the most probable — yet still unproved — hypothesis is to admit that tumors (both sarcomas and carcinomas) supply the blood with a substance, influencing an enzyme system of the PA-metabolism.

While my experiments confirm the often proved fact of the approximately proportional increase of PA in relation to the size of the tumor, yet it seems me appropriate to record the fact that specially Jensen sarcoma, whose behaviour in the increase of PA percentage is fairly constant, when transplanted in subcutaneous tissue has in several of my experiments, caused an increase of PA independently from the development in size and more noticeable in the first 20 days.¹

Stockholm, University, Institute for Research in Organic Chemistry and Vitamin Institute.

¹ Compare EULER et al. Z. f. Krebsf. 55 (1944), p. 18.

Tryckt den 10 januari 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Mixed bismuth oxides with layer lattices

II. Structure of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$

By BENGT AURIVILLIUS

With 5 figures in the text

By means of X ray analysis it has been found that the crystal structures of a number of bismuth oxyhalides consist of $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers alternating with layers of halogen ions (1, 2). In all these cases the symmetry was found to be tetragonal and the lengths of the a axes almost constant ≈ 3.8 Å.

On making an X ray study of the system Bi_2O_3 — TiO_2 a phase (of composition about 40 atomic % TiO_2) was found, the powder photographs of which could be explained by assuming a pseudo-tetragonal cell with $a = 3.84$ and $c = 32.8$ Å. It seemed of interest to make a closer study of this phase since the cell dimensions and composition seemed to indicate a layer lattice with $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers, but of a type hitherto uninvestigated.

Procedure: Weighed amounts of Bi_2O_3 (puriss) and TiO_2 (puriss) were mixed and heated to about 1100°C for some hours in a weighed platinum crucible. After cooling the crucible was weighed again and the composition calculated by assuming that the loss of weight could be ascribed to the volatility of Bi_2O_3 . Powder photographs of various preparations in the system Bi_2O_3 — TiO_2 indicated that there is a phase with a body-centered pseudo-tetragonal unit cell with $a = 3.841$ and $c = 32.83$ Å at compositions about 40 mole % TiO_2 . It was, however, impossible to get samples which were quite free from impurities so the powder photographs always contained a few extra lines.

The lines $21l$, $22l$ and $31l$ were found to be split up. No cleavage was, however, found for the lines $10l$, $20l$ and $30l$. This could be explained by assuming a face-centered orthorhombic unit cell with the same c axis as the pseudo-tetragonal cell and with its a and b axes equal to the diagonals ($a\sqrt{2}$) of the pseudo cell.

The orthorhombic axes will be: $a = 5.410$ $b = 5.448$ $c = 32.84$ Å. The observed density (40 mole % TiO_2) is 7.85. If the composition is assumed to be $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$ (43 mole % TiO_2) and 4 formula units are assumed per unit cell the calculated density will be 8.04 which agrees fairly well with the observed value.

Single crystals, thin plates, were picked out and Weissenberg photographs (zero layer and first layer) were taken around the 3.84 axes, thus registering $h0l$ and $h1l$ (pseudo cell) or hhl and $h, h + 2, l$ (orthorhombic cell).

Though there was nothing in the Weissenberg photographs to indicate a lower Laue symmetry than $D_{4h} = 4/m\bar{m}m$, it was — as has already been mentioned — found from the powder photographs that the real symmetry was not higher than orthorhombic (Laue symmetry $D_{2h} = m\bar{m}m$).

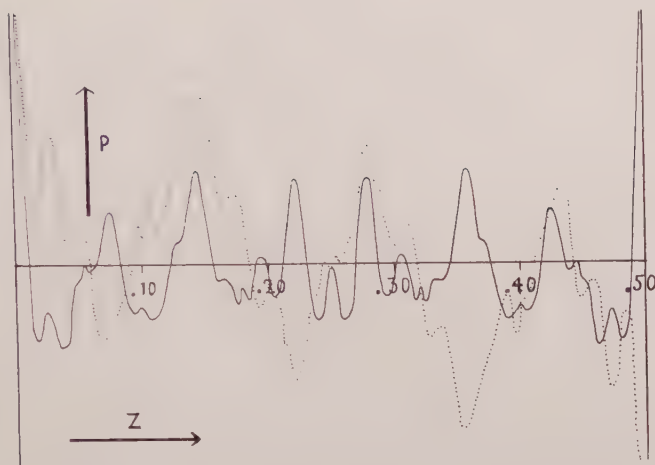
Except for the extinctions following from the face-centering (hkl occurring only for h, k, l all odd or even) no systematic extinctions were found, which is characteristic of the space groups C_{2v}^{18} , D_2^7 and D_{2h}^{23} .

Positions of the bismuth atoms

Since the intensities of hkl with h, k, l all odd on one side and the intensities of hkl with h, k, l all even on the other side appeared to vary in the same way with l (see Table 1), it seemed probable that at least the bismuth atoms are situated on the lines: $(000; \frac{1}{2}\frac{1}{2}0; 0\frac{1}{2}\frac{1}{2}; \frac{1}{2}0\frac{1}{2}) + 00z$. The sum of $\sum_l I_{00l} \cos 2\pi lz$ and $\sum_l I_{11l} \cos 2\pi lz$ will under such conditions represent the Patterson function along $00z$. These two sums are pictured in figure 1. It is seen from the graph that high maxima occur at $z = 0.144, 0.280$ and 0.428 . If $C_{2v}^{18}c$ is not considered, only the following positions on the lines $00z$

Table 1
Weissenberg Photographs of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$. Cu K_α radiation

l	$I_{\text{calc.}}$	$I_{\text{obs.}}$				l	$I_{\text{calc.}}$	$I_{\text{obs.}}$		
		00	20 or 02	22	42 or 24			11	31 or 13	33
2	4.4		—	vvw	—	1	130	vst	m	m
4	20		w	w	—	3	14	w	—	—
6	85	m	m	m	w	5	18	m	vvw	—
8	180	m	m	m	w ⁺	7	390	vst	m ⁺	m ⁺
10	8.4	w	m	vvw	—	9	0.01	—	—	—
12	42	m	m	w	—	11	26	w	vw	vw
14	360	vst	m	m	m	13	42	w	vw	vw
16	3.6	m ⁺	—	vvw	—	15	230	w	vw	—
18	32	m	w	vvw	—	17	4.4	—	—	—
20	12	m	w	—	—	19	74	m	vvw	vw
22	260	st	st	m	m	21	300	st	m	w
24	2.0	w	w	vw	—	23	14	m	w	vw
26	110	m	st	st	m ⁺	25	37	m	m	w
28	240	m	st	st	st	27	0.09	—	—	—
30	27	w	m	m	m	29	280	st	st	st
32	40	m	st	m	st	31	0.6	w	w	—
34	7.8	vw	w	vw	—	33	150	st	st	st
36	280	m	vst	vst	—	35	170	st	st	—
38	0.1	vw	w	vw	—	37	41	m	m	—
40	190	m	vst	—	—	39	40	st	—	—
42	110	m	—	—	—	41	36	m	—	—


 Figure 1. Patterson function of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$ along $00z$

Full curve:
$$\sum_l I_{00l} \cos 2\pi lz$$

Dotted curve:
$$\sum_l I_{11l} \cos 2\pi lz \quad (\text{orthorhombic indices})$$

are possible for the Bi atoms: The two 4-fold positions 000 and $00\frac{1}{2}$ and the 8-fold positions $\pm 00z$. Assuming that the unit cell contains 16 Bi it was found that the observed maxima in the graph could be explained by assuming that the 16 Bi atoms are situated in two 8-fold positions $\pm 00z$. In this way three possibilities arose:

- | | | |
|----|---------------|-----------------|
| a. | $z_1 = 0.215$ | $z_2 = 0.356$ |
| b. | $z_1 = 0.072$ | $z_2 = 0.356$ |
| c. | $z_1 = 0.072$ | $z_2 = 0.215$. |

If the influence of the Ti and the O atoms is neglected the Patterson maxima will have the following relative weights:

	a	b	c
0.144	2	1	3
0.280	1	3	2
0.428	3	2	1

If the two curves in figure 1 are added and the areas under the peaks calculated, the ratio of $(0.144) : (0.280) : (0.428)$ is found to be: $4.4 : 2.6 : 1.0$. Now, these figures cannot be directly compared with the figures given above, since the zero level in the graph is unknown. It is, however, seen that the observed order of magnitude of the peaks (0.144) (0.280) and (0.428) is the same as

that calculated for c. Case c was therefore assumed, and z_1 and z_2 were varied around 0.072 and 0.215. The observed intensities were found to agree quite well with those calculated for $z_1 = 0.067 \pm 0.004$ and $z_2 = 0.211 \pm 0.004$. In Table 1 the observed intensities are compared with intensities calculated as follows: $I = A^2 \quad A = 10 (\cos 2\pi l z_1 + \cos 2\pi l z_2) = 10 F/4 f_{\text{Bi}}$. In Table 1 the lines of maximum absorption (see (4)) are indicated by dotted lines. If allowance is made for the polarisation factors and the absorption effect (4), it is seen that for h, k, l all odd the observed and calculated intensities agree quite well. For h, k, l all even the calculated ratios of 0016:0018 and 2216:2218 are inversed in comparison with the observed ratios. This might be due to the influence of the Ti and the O atoms.

Positions of the Ti atoms

With the formula assumed the unit cell contains 12 Ti atoms. If the space group $C_{2v}^{18}c$ is not considered, the only 4-fold positions possible are:

$$\begin{aligned} 4 \text{ (a) } x00 \text{ or } 0y0 \text{ (} C_{2v}^{18} a \text{ or } b), \quad 4 \text{ (a) } 000 \quad 4 \text{ (b) } 00\frac{1}{2} \text{ (} D_2^7, D_{2h}^{23}), \\ 4 \text{ (c) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4} \quad 4 \text{ (d) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4} \text{ (} D_2^7) \end{aligned}$$

The positions 000, $\frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4}$ seemed very improbable since the distance Bi—Ti would then be only 2.2–2.4 Å. For the remaining positions $00\frac{1}{2}$, $x00$ (or $0y0$) x (or y) must lie within the limits 0.38–0.62, if the minimum distance Bi—Ti is assumed to be 3.0 Å. If the distance Ti—Ti is assumed to be ≥ 3.0 Å, only 4 Ti can be situated in 4-fold positions and the remaining 8 Ti must occupy one 8-fold position. Of 8-fold positions the following seemed to be possible:

$$\begin{aligned} 8 \text{ (d) } x0z, x0\bar{z} \text{ (or } 0yz, 0y\bar{z}) \text{ } C_{2v}^{18} a \text{ or } b, \quad 8 \text{ (g) } \pm 00z \text{ (} D_2^7, D_{2h}^{23}), \\ 8 \text{ (h) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z, \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2} - z \text{ (} D_2^7) \end{aligned}$$

Thus there seemed to be two ways of arranging the Ti atoms:

1. 4 Ti₁ in $00\frac{1}{2}$, 8 Ti₂ in $\frac{1}{4}\frac{1}{4}z, \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2} - z \quad 0.133 \leq z \leq 0.147$
2. 4 Ti₁ in $00\frac{1}{2}, x00$ (or $0y0$) $0.38 \leq x \leq 0.62$ (or $0.32 \leq y \leq 0.68$)
8 Ti₂ in $\pm 00z \quad 0.324 \leq z \leq 0.398, x0z, x0\bar{z}$ (or $0yz, 0y\bar{z}$)
 $0.38 \leq x \leq 0.62$ (or $0.38 < y < 0.62$) $0.102 \leq z \leq 0.176$

Both for 1 and 2 the parameters are chosen as to make the distances Bi—Ti ≥ 3.0 Å. The region possible for the Ti₂ atoms — assuming arrangement 2 — is shown by the shaded area in figure 2.

By calculating the intensities of $00l$ for various z_{Ti} values, it was found that the calculated ratio 0016:0018 (see the discussion on the Bi positions) was best for $z \sim 0.13_0$ or 0.37_0 .

The intensities of the spots in the Weissenberg photographs were then calculated for the arrangements 1 and 2 but no decision between 1 and 2 could be made by comparison with the observed intensities. It was therefore tried to find possible arrangements for the O atoms with both 1 and 2.

Case 1

Space group D_2^7 and the following positions for the metal atoms were assumed:

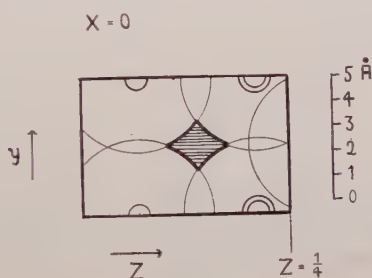
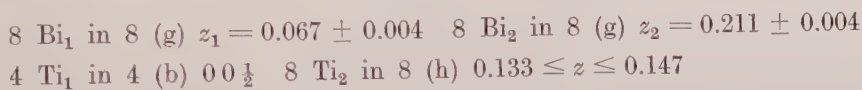
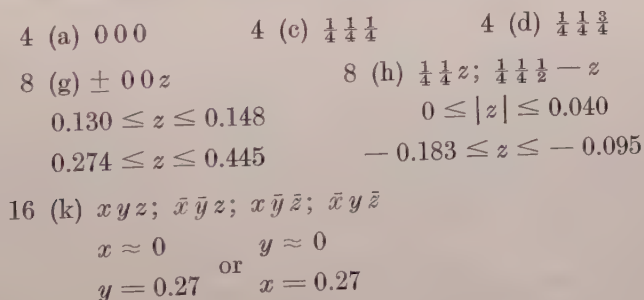


Figure 2.

By assuming that the distances $\text{Bi}-\text{O} \geq 2.2$, $\text{Ti}-\text{O} \geq 1.8$ and $\text{O}-\text{O} \geq 2.5 \text{ \AA}$, the following positions were found possible for the O atoms:



Two regions are possible:

$$z = 0.113 \text{ (for } z_{\text{Ti}} = 0.147) \text{ and } z = 0.165 \text{ (for } z_{\text{Ti}} = 0.132)$$

No combinations of these positions could be found giving reasonable distances and octahedra around the Ti atoms, as is the case in previously investigated structures containing Ti^{4+} and O^{2-} . Arrangement 1 seemed therefore improbable.

Case 2

The positions of the metal atoms are assumed to be:

$$8 \text{ Bi}_1 \text{ in } \pm 00z_1 \quad z_1 = 0.067 \pm 0.004 \quad 8 \text{ Bi}_2 \text{ in } \pm 00z_2 \quad z_2 = 0.211 \pm 0.004$$

$$4 \text{ Ti}_1 \text{ in } 00\frac{1}{2}, x00 \text{ (or } 0y0) \quad 0.38 \leq x, y \leq 0.62 \quad 8 \text{ Ti}_2 \text{ in } \pm 00z, \\ 0.324 \leq z \leq 0.398$$

$$x0z; x0\bar{z} \text{ (or } 0yz; 0y\bar{z}) \quad 0.38 \leq x, y \leq 0.62 \\ 0.102 \leq z \leq 0.176$$

At first only space group D_2^7 was considered (Ti_1 in $00\frac{1}{2}$ and Ti_2 in $\pm 00z$). The following positions were found possible for the O atoms making the same assumptions as in case 1:

$$\begin{array}{lll} 4 \text{ (a) } 000 & 4 \text{ (c) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4} & \\ 4 \text{ (d) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4} & 8 \text{ (g) } \pm 00z & 8 \text{ (h) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2} - z \\ & 0.130 \leq z \leq 0.148 & 0 < |z| < 0.040 \\ & 0.379 \leq z \leq 0.445 & 0.095 < |z| < 0.183 \\ & 0.274 \leq z \leq 0.343 & \\ 16 \text{ (k) } xyz; x\bar{y}z; x\bar{y}\bar{z}; x y \bar{z} & & \\ x = 0.25 \pm 0.02 & y = 0.25 \pm 0.02 & \\ y \sim 0 & \text{or} & x \sim 0 \\ & 0.114 < z < 0.163 & \end{array}$$

It was tried to find positions for the O atoms so that Ti_1 and Ti_2 would be surrounded by regular or almost regular octahedra of O atoms with distances $1.8 \leq \text{Ti}-\text{O} \leq 2.5 \text{ \AA}$. For O atoms in contact with Ti_1 , the following point positions are possible: 8 (h) $0 < |z| < 0.040$, 8 (g) $0.424 \leq z \leq 0.445$. With 8 O situated at $\frac{1}{4}\frac{1}{4}0$; $\frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}$ and 8 O at ± 00.442 regular octahedra of O would surround Ti_1 . It, therefore, seemed probable that oxygen atoms are situated near these positions.

For oxygen atoms in contact with Ti_2 , the following positions are possible:

$$\begin{array}{ll} 8 \text{ (g}_1\text{)} \quad 0.379 \leq z_1 \leq 0.445 & 8 \text{ (h)} \quad 0.095 \leq |z| \leq 0.183 \\ 8 \text{ (g}_2\text{)} \quad 0.274 \leq z_2 \leq 0.343 & 16 \text{ (k)} \quad 0.114 \leq z \leq 0.163 \end{array}$$

With one set of oxygen atoms situated at 8 (h) or 16 (k), every Ti_2 atom will be in contact with two oxygen atoms, while if oxygen atoms are situated at 8 (g_1) or 8 (g_2), Ti_2 will be in contact with only one oxygen atom. It was

found that only one set of oxygen atoms could occupy the positions 16 (k), 8 (g_1) and 8 (g_2), while at most 32 oxygen atoms could be situated in positions 8 (h). The following arrangements allowing Ti_2 to be in contact with 6 O are possible:

- a. 16 O (k) + 8 O (h) + 8 O (h)
- b. 16 O (k) + 8 O (g_1) + 8 O (g_2) + 8 (h)
- c. 8 O (h) + 8 O (h) + 8 O (h)
- d. 8 O (h) + 8 O (h) + 8 O (g_1) + 8 O (g_2)

With a and b no combination of positions could be found, giving octahedra of oxygen atoms around Ti_2 .

c. With 8 O in $\frac{1}{4}\frac{1}{4}0$; $\frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}$, 8 O in 00 0.442 and 24 O in positions 8 (h) ($z_1 \approx 0.102$ $z_2 \approx -0.139$ $z_3 \approx 0.177$) so as to form octahedra of oxygen atoms around Ti_1 and Ti_2 , there was room for the remaining 8 O atoms only in the position $\pm 00z$ $z = 0.274$ or in the positions 4 (c) + 4 (d). With these arrangements, however, the distances O — O would be short (≈ 2.4 Å).

With d, positions for the oxygen atoms could be chosen, allowing reasonable distances and giving octahedra of oxygen atoms around Ti_2 . Arrangement d was, therefore, preferred to the arrangements a, b and c.

The following parameters were assumed for oxygen atoms in contact with Ti_1 or Ti_2 :

$$\begin{aligned}
 &8 \text{ O}_1 \text{ in } 8 \text{ (h) } z = 0 \\
 &8 \text{ O}_4 \text{ in } 8 \text{ (g) } z = 0.436 \\
 (z_{Ti_2} = 0.372) \quad &8 \text{ O}_5 \text{ in } 8 \text{ (g) } z = 0.308 \\
 &8 \text{ O}_6 \text{ in } 8 \text{ (h) } z = 0.128 \\
 &8 \text{ O}_7 \text{ in } 8 \text{ (h) } z = -0.128
 \end{aligned}$$

Even if these parameters are varied considerably around the values given, room for the remaining 8 O is left only in the positions 4 (c) and 4 (d) (0_2 , 0_3).

The positions arrived at might also be described with space group D_{2h}^{23} —F *m m m* as follows:

$$\begin{aligned}
 &8 \text{ O}_1 \text{ in } 8 \text{ (e) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}0; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2} \\
 &8 \text{ O}_2 \text{ in } 8 \text{ (f) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4}, \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4} \\
 &8 \text{ O}_3 \text{ in } 8 \text{ (i) } \pm 00z \quad z = 0.436 \\
 &8 \text{ O}_4 \text{ in } 8 \text{ (i) } \pm 00z \quad z = 0.308 \\
 &16 \text{ O}_5 \text{ in } 16 \text{ (j) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\bar{z}; \\
 &\quad \frac{1}{4}\frac{3}{4}z; \frac{1}{4}\frac{3}{4}\bar{z} \\
 &\quad z = 0.128
 \end{aligned}$$

The distances and coordination will be:

$\text{Bi}_1 - 4 \text{ O}_1 = 2.92$	$\text{Ti}_2 - \text{O}_3 = 2.10$	$\text{Ti}_1 - 4 \text{ O}_1 = 1.92$
$\text{Bi}_1 - 4 \text{ O}_3 = 2.72$	$\text{Ti}_2 - \text{O}_4 = 2.10$	$\text{Ti}_1 - 2 \text{ O}_3 = 2.10$
$\text{Bi}_1 - 4 \text{ O}_5 = 2.76$	$\text{Ti}_2 - 4 \text{ O}_5 = 1.92$	
$\text{Bi}_2 - 4 \text{ O}_2 = 2.79$	$\text{O}_1 - 4 \text{ O}_1 = 2.71$	
$\text{Bi}_2 - 4 \text{ O}_4 = 2.79$	$\text{O}_3 - 4 \text{ O}_1 = 2.83$	
$\text{Bi}_2 - 4 \text{ O}_5 = 2.29$	$\text{O}_4 - 4 \text{ O}_2 = 2.70$	
	$\text{O}_4 - 4 \text{ O}_5 = 2.83$	
	$\text{O}_5 - 4 \text{ O}_5 = 2.71$	

No new combinations were found if the space group D_{2h}^{23} was assumed instead of D_2^7 .



Figure 3 a.



Figure 3 b.

Since $a \approx b$ and the positions of the O atoms must be chosen from space considerations, it does not matter whether space group $C_{2v}^{18} a$ or b is assumed. $C_{2v}^{18} b$ was assumed arbitrarily. It was found that oxygen atoms could only be situated in the planes $x=0$, $x=0.25 \pm 0.02$, $x=\frac{1}{2}$ and $x=0.75 \pm 0.02$. Thus the following positions are possible:

4 (a) $0y0$	8 (b) $\frac{1}{4}y\frac{1}{4}; \frac{1}{4}y\frac{3}{4}$	8 (c) $0yz; 0y\bar{z}$
8 (d) $xy0; \bar{x}y0$	16 (e) $xyz; \bar{x}y\bar{z}; \bar{x}yz; x\bar{y}\bar{z}$	
$x = 0.25 \pm 0.02$	$x = 0.25 \pm 0.02$	

Table 2

 Weissenberg Photographs of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$. Cu K_α radiation

Zero Layer

0 0 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.	2 0 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.
6	56	m	2	1.0	vw
8	61	m	4	12	w
10	12	w	6	59	m
12	58	m	8	81	m
14	450	vst	10	12	vw
16	88	m ⁺	12	55	w
18	30	m	14	440	m
20	19	m ⁻	16	64	vw
22	200	st	18	31	vw
24	27	w	20	19	—
26	120	m	22	200	m
28	230	m	24	26	vw
30	62	w	26	120	st
32	140	m ⁻	28	230	st
34	4.0	vw	30	62	m ⁻
36	300	m	32	120	m
38	9.0	vw	34	4.0	vw
40	110	m	36	290	vst
42	93	m	38	8.0	vw

1 0 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.	3 0 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.
1	52	vst	1	69	m
3	7.0	w	3	8.0	—
5	17	m ⁻	5	18	—
7	470	vst	7	470	m ⁺
9	2.0	—	9	3.0	—
11	23	w	11	22	vw
13	46	w	13	45	vw
15	120	w	15	130	—
17	23	—	17	21	—
19	98	m	19	93	vw
21	320	st	21	320	w
23	36	m	23	36	vw
25	52	m	25	53	w
27	0.6	—	27	0.8	—
29	270	st	29	270	st
31	19	w	31	19	—
33	110	st			
35	140	st			
37	53	m			
39	75	st			
41	44	m			

Table 2 (cont.)

First Layer

1 1 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.	3 1 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.
2	1.0	—	2	1.0	—
4	12	w	4	12	—
6	64	m	6	66	w
8	220	m	8	180	w ⁺
10	15	m	10	14	—
12	57	m	12	58	—
14	410	m	14	410	m
16	15	—	16	16	—
18	41	w	18	40	—
20	20	w	20	19	—
22	220	st	22	220	m
24	2.0	w	24	3.0	—
26	98	st	26	98	m ⁺
28	210	st	28	220	st
30	47	m	30	47	m
32	74	st	32	67	st
34	9.0	w			
36	310	vst			
38	4.0	w			
40	180	vst			
1 0 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.	2 1 <i>l</i>	<i>I</i> calc.	<i>I</i> obs.
5	17	w	1	67	m
7	470	vst	3	8.0	—
9	2.0	vvw	5	18	vvw
11	23	m	7	470	m ⁺
13	46	m	9	2.0	—
15	120	m ⁺	11	23	vvw
17	23	w	13	46	vw
19	98	m ⁺	15	130	vw
21	320	st	17	22	—
23	36	m	19	96	vvw
25	52	m	21	320	m
27	0.6	—	23	35	w
29	270	st	25	50	m
31	19	w	27	0.8	—
33	110	st	29	270	st
35	140	st	31	19	w
37	53	m	33	110	st
39	75	st	35	140	st
41	44	st	37	53	m

Table 3

Powder Photographs of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$. Cr K radiation, orthorhombic description

hkl	10^4 $\sin^2 \theta_{\text{calc.}}$	10^4 $\sin^2 \theta_{\text{obs.}}$	$I_{\text{obs.}}$	hkl	10^4 $\sin^2 \theta_{\text{calc.}}$	10^4 $\sin^2 \theta_{\text{obs.}}$	$I_{\text{obs.}}$
008	0779	0771	st	11 19	5282	5292	m
111	0903	0895	m	22 12	5314		
115	1195	1188	vvw	02 18	5710	5734	vvw
—	—	1288	m	20 18	5735		
—	—	1336	w	00 22	5887	5892	m
117	1487	1480	vst	13 11	5900		
—	—	1614	vw	22 14	5946	5949	m
00 12	1752	1752	m	31 11	5950		
020	1769			11 21	6255	6267	st
200	1794	1790	w	02 20	6635		
024	1964	1952	vw	20 20	6660	6664	vw
β 00 14	1974	1974	m	22 16	6676		
204	1989			040	7074	7070	vw
00 14	2384	2384	vst	13 15	7165	7172	m
028	2548	2565	st	400	7174		
208	2573			31 15	7215	7221	m
11 13	2947	2947	m	402	7223		
β 220	2953			11 23	7326	7335	w
02 10	2985	3005	w	22 18	7503	7511	w
β 11 15	3003			046	7512		
20 10	3010	3115	m	02 22	7656	7674	m
00 16	3114			20 22	7681		
02 12	3521	3538	vvw	00 26	8223	8223	w
20 12	3546			11 25	8494		
220	3562	3567	m	337	8611	8611	m
11 15	3628	3638	m	20 24	8801		
00 18	3941	3942	w	13 19	8819	8806	vw
226	4000	4006	w	04 12	8826		
02 14	4153	4171	st	240	8868	8859	w
β 137	4159			31 19	8869		
20 14	4178	4333	w	242	8917	8934	vw
β 317	4200			40 12	8926		
228	4341	4418	vvw	420	8943	9458	st
11 17	4406			22 22	9449		
131	4440	4428	vvw	04 14	9458	9551	m
311	4482	4490	vvw	00 28	9537		
00 20	4866	4880	w	40 14	9558	9652	vw
02 16	4883			248	9647		
20 16	4908	4923	w	428	9722	9714	vw
β 22 14	4922			13 21	9792	9785	w
137	5024	5029	m				
317	5074	5078	m				

The positions of the Ti atoms are assumed to be:

$$4 \text{ Ti}_1 \text{ in } 4 \text{ (a)} \quad 0.38 \leq y_1 \leq 0.62$$

$$8 \text{ Ti}_2 \text{ in } 8 \text{ (c)} \quad 0.38 \leq y_2 \leq 0.62 \quad 0.102 \leq z_2 \leq 0.176$$

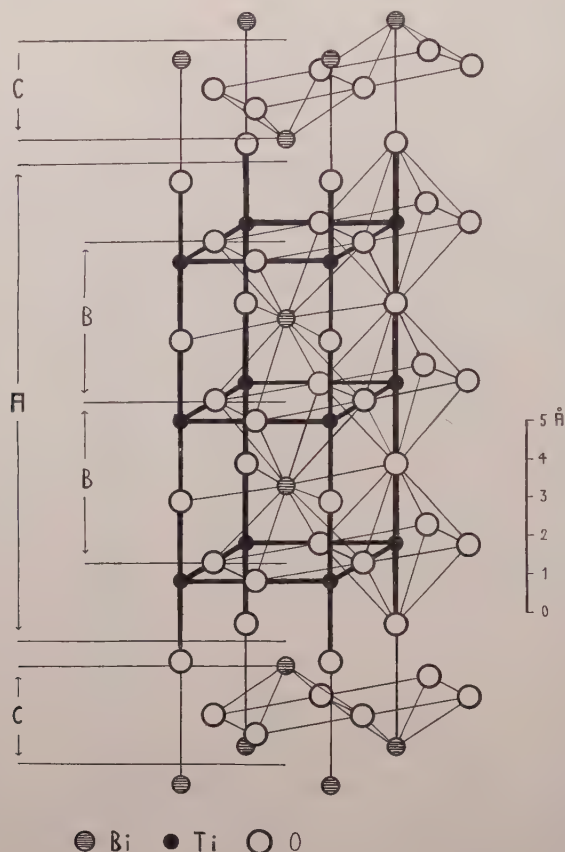


Figure 4.

One half of the pseudo-tetragonal unit cell of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$ (from $z \approx 0.25$ to $z \approx 0.75$). A denotes the perovskitic layer $\text{Bi}_2\text{Ti}_3\text{O}_{10}$, C $\text{Bi}_2\text{O}_7^{2+}$ layers and B unit cells of the hypothetical perovskite structure BiTiO_3 .

In figures 3 a and 3 b sections of one fourth of the unit cell are made for $x = 0$ and $x = 0.25$. (The projections of the positions of the Bi_1 , Bi_2 and Ti atoms are denoted by: white circles, double circles and black circles respectively. The same scale is used as for figure 2). Regions where oxygen atoms might be situated are shown by shaded areas. In figure 3 a the positions of the Ti atoms are assumed to be: $00\frac{1}{2}$ and $0yz$; $0yz$ $y = 0.62$ $z = 0.139$ and in figure 3 b, $0y0$ $y = 0.62$ and $\pm 00z$ $z = 0.324$.

As in the discussion above it was tried to find positions for the O atoms giving an octahedral arrangement around Ti_1 and Ti_2 . Only with O atoms situated in the positions 8 (d) $x \approx \frac{1}{4}$ $y \approx y_1 + \frac{1}{4}$ and 8 (c) $y \approx y_1$ $z \approx 0.058$ would Ti_1 be surrounded by regular octahedra (see figure 3). It was therefore assumed that these positions are occupied by oxygen atoms. For oxygen atoms in contact with Ti_2 , the point positions 8 (c) and 16 (e) are possible. With 8 O situated at 8 (c), every Ti atom is in contact with one oxygen atom; with 16 O in 16 (e), Ti_2 may be in contact with 2 O (e_2) or 4 O ($y \approx y_2 + \frac{1}{4}$ $z \approx z_2$) (e_4). Bear-

ing in mind that the unit cell contains 48 O and assuming 16 O to be situated at 8 (c) : 8 (d) (so as to form an octahedron around Ti₁), the following arrangements giving 6 O around Ti₂ seemed possible:

$$\text{a. } 8 \text{ O (c) } + 8 \text{ O (c) } + 16 \text{ O (e}_4\text{)}$$

$$\text{b. } 16 \text{ O (e}_2\text{) } + 16 \text{ O (e}_4\text{)}.$$

With b. no combination giving octahedra of O around Ti₂ could be found. With a., however, arrangements could be found allowing Ti₂ to be surrounded by an almost regular octahedron. The following parameters for oxygen atoms in contact with Ti₁ or Ti₂ were assumed:

$$8 \text{ O}_1 \text{ in } 8 \text{ (d) } \quad x \approx \frac{1}{4} \quad y \approx y_1 + \frac{1}{4}$$

$$8 \text{ O}_2 \text{ in } 8 \text{ (c) } \quad y \approx (y_1 + y_2)/2 \quad z \approx z_2/2$$

$$8 \text{ O}_3 \text{ in } 8 \text{ (c) } \quad y \approx y_2 \quad z \approx 3z_2/2$$

$$16 \text{ O}_4 \text{ in } 16 \text{ (e) } \quad x \approx \frac{1}{4} \quad y \approx x_2 + \frac{1}{4} \quad z \approx z_2$$

For the remaining 8 O there seemed to be room only in the position 8 (b) $y \approx \frac{1}{4}$. It is seen that these positions are basically the same as were arrived at when space group D₂⁷ was assumed, except for possible small shifts in the y direction.

Thus no new arrangement was found by assuming C_{2v}¹⁸ a or b . In Table 2 (pseudo-tetragonal indices) the intensities, calculated by means of the formula $I = (10 F/4 f_{\text{Bi}})^2$, are compared with the observed ones. Since the ratios $f_{\text{Ti}}/f_{\text{Bi}}$ and $f_{\text{O}}/f_{\text{Bi}}$ vary with $\sin \theta/\lambda$ they were interpolated for every reflection from values taken from the International Tables (3). Table 2 shows good agreement between the calculated and observed intensities.

The following structure is thus proposed:

$$D_{2h}^{23} - F \quad m m m$$

$$(000; 0\frac{1}{2}\frac{1}{2}; \frac{1}{2}0\frac{1}{2}; \frac{1}{2}\frac{1}{2}0) +$$

$$8 \text{ Bi}_1 \text{ in } 8 \text{ (i) } \pm 00z \quad z = 0.067$$

$$8 \text{ Bi}_2 \text{ in } 8 \text{ (i) } \pm 00z \quad z = 0.211$$

$$4 \text{ Ti}_1 \text{ in } 4 \text{ (b) } 00\frac{1}{2}$$

$$8 \text{ Ti}_2 \text{ in } 8 \text{ (i) } \pm 00z \quad z = 0.372$$

$$8 \text{ O}_1 \text{ in } 8 \text{ (e) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}0; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{2}$$

$$8 \text{ O}_2 \text{ in } 8 \text{ (f) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{1}{4}; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\frac{3}{4}$$

$$8 \text{ O}_3 \text{ in } 8 \text{ (i) } \pm 00z \quad z = 0.436$$

$$8 \text{ O}_4 \text{ in } 8 \text{ (i) } \pm 00z \quad z = 0.308$$

$$16 \text{ O}_5 \text{ in } 16 \text{ (j) } \frac{1}{4}\frac{1}{4}z; \frac{1}{4}\frac{1}{4}\bar{z}; \frac{1}{4}\frac{3}{4}z; \frac{1}{4}\frac{3}{4}\bar{z} \quad z = 0.128$$

For the pseudo-tetragonal cell the positions will be:

$$\begin{aligned}
 &D_{4h}^{17} - I \ 4/m\ m\ m \\
 &(0\ 0\ 0; \tfrac{1}{2} \ \tfrac{1}{2} \ \tfrac{1}{2}) + \\
 &4 \text{ Bi}_1 \text{ in } 4 \text{ (e)} \ \pm \ 0\ 0\ z \quad z = 0.067 \\
 &4 \text{ Bi}_2 \text{ in } 4 \text{ (e)} \ \pm \ 0\ 0\ z \quad z = 0.211 \\
 &2 \text{ Ti}_1 \text{ in } 2 \text{ (b)} \ 0\ 0 \ \tfrac{1}{2} \\
 &4 \text{ Ti}_2 \text{ in } 4 \text{ (e)} \ \pm \ 0\ 0\ z \quad z = 0.372 \\
 &4 \text{ O}_1 \text{ in } 4 \text{ (c)} \ 0 \ \tfrac{1}{2} \ 0; \ \tfrac{1}{2} \ 0\ 0 \\
 &4 \text{ O}_2 \text{ in } 4 \text{ (d)} \ 0 \ \tfrac{1}{2} \ \tfrac{1}{4}; \ \tfrac{1}{2} \ 0 \ \tfrac{1}{4} \\
 &4 \text{ O}_3 \text{ in } 4 \text{ (e)} \ \pm \ 0\ 0\ z \quad z = 0.436 \\
 &4 \text{ O}_4 \text{ in } 4 \text{ (e)} \ \pm \ 0\ 0\ z \quad z = 0.308 \\
 &8 \text{ O}_5 \text{ in } 8 \text{ (g)} \ \pm \ (0 \ \tfrac{1}{2} \ z; \ \tfrac{1}{2} \ 0 \ \bar{z}) \quad z = 0.128
 \end{aligned}$$

In figure 4 one half of the pseudo-tetragonal unit cell is pictured. The structure consists of $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers alternating with $\text{Bi}_2\text{Ti}_3\text{O}_{10}^{2-}$ layers. The arrangements of the atoms within the $\text{Bi}_2\text{Ti}_3\text{O}_{10}^{2-}$ layers seems to be the same as that found for perovskite structures, and it is easily found by calculation that the geometrical properties of the Bi^{3+} , Ti^{4+} and O^{2-} ions make a perovskite structure possible. Thus the structure might be looked upon as a layer structure where perovskitic layers $\text{Bi}_2\text{Ti}_3\text{O}_{10}^{2-}$ — corresponding to a hypothetical perovskite structure BiTiO_3 — alternate with $\text{Bi}_2\text{O}_2^{2+}$ layers. With the notations given by LAGERCRANTZ and SILLÉN (5), the above structure might be denoted by X_{III} .

I wish to thank Professor L. G. SILLÉN for valuable discussions concerning this work.

Stockholms Högskola, Institute of Inorganic and Physical Chemistry, 1949.

- REFERENCES. 1. Bannister, F. A. and Hey, M. H., *Miner. Mag.* 24 (1935), 49. — 2. Sillén, L. G., *Dissert.* Stockholm 1940. — 3. Internationale Tabellen zur Bestimmung von Kristallstrukturen, Berlin 1935. — 4. Wells, A. F., *Z. Krist.* 96 (1937), 451. — 5. Lagercrantz, Å. and Sillén, L. G., *Arkiv f. Kemi etc.* 25 (1947), 49.

Tryckt den 10 januari 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Crystal structure studies on β -tungsten oxide

By ARNE MAGNÉLI

With 6 figures in the text

In a previous paper from this Institute (1) a few preliminary data were given concerning the blue monoclinic β -tungsten oxide of the approximate composition $\text{WO}_{2.90}$. Further information about this compound has been obtained during a continued investigation and will be reported here.

Unit cell, cell content and space group

As was pointed out in (1) the Weissenberg photographs of the β -tungsten oxide are rather peculiar in appearance, the spots to a great extent being arranged in triplets or doublets. The reproducibility of this phenomenon was established by taking photographs of several crystals. Due to the crystal needles being extremely thin it was only possible to rotate them around the needle axis (the monoclinic axis). Rotation and Weissenberg photographs (layer lines 0-2) were registered with Cu-K radiation, as scarcely any reflections could be observed on the film when using Mo-K radiation. The intensities of the reflections were estimated visually, starting from 4:2:1 as relative values for the intensities of α_1 , α_2 , and β radiation. The intensity scales of the various layer lines were correlated by means of a "Weissenberg oscillation photograph" (2). Relative values of the structure amplitudes were obtained by multiplying the intensity values by $\cos^2 \mu \cdot \sin \gamma / (1 + \cos^2 \theta)$. The temperature factor was not taken into consideration.

The reciprocal lattice plane $h0l$ is illustrated in Fig. 1, the $h1l$ and $h2l$ planes showing the corresponding reflections with intensities decreasing with k . All the observed lattice points are closely attached to the intersection points of a square network with the edge length corresponding to about 3.75 Å. As the length of the b axis is 3.78 Å¹ the cell of the substructure as was pointed out in (1) contains only one formula unit $\text{WO}_{2.90}$. It has now been possible to find a reciprocal network consistent with all actually observed lattice points and corresponding to the following unit cell dimensions²:

$$a = 12.1 \text{ Å}, b = 3.78 \text{ Å}, c = 23.4 \text{ Å}, \beta = 95^\circ, V = 1.065 \text{ Å}^3.$$

¹ No displacements of reflections from the layer lines mentioned above could be observed in the rotation photograph. There is evidently no superstructure present in the b direction.

² The length of one of the axes (the c axis) and the content of the unit cell proposed in (1) were given too high values.

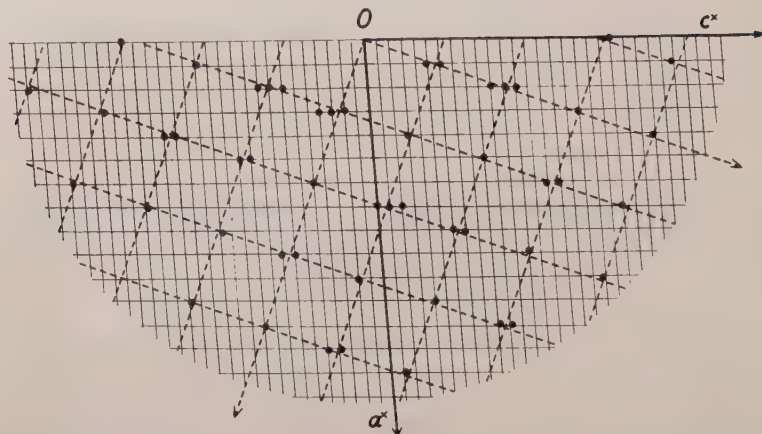


Fig. 1. The reciprocal lattice plane $h0l$ (the planes $h1l$ and $h2l$ look essentially the same). Lattice points corresponding to observed reflections are marked with dots. The reciprocal networks of the substructure and the real structure are indicated by dotted and full lines respectively.

The density of the preparation $\text{WO}_{2.90}$ (42 days, 1050°C) was found to be 7.15^1 . This corresponds to a cell content of 19.9 formula units $\text{WO}_{2.90}$, suggesting $20\text{WO}_{2.90} = \text{W}_{20}\text{O}_{58}$ as a probable value.

The observed layer lines $h0l$, $h1l$, and $h2l$ do not show any characteristic missing spectra. Reflections $0k0$ have not been registered but from the fact that the intensities of reflections hkl are steadily decreasing with k increasing it may nevertheless be concluded that the structure does not contain twofold screw axes. Thus the space-groups $C_{2h}^1 - P2/m$, $C_2^1 - P2$, and $C_s^1 - Pm$ have to be considered. Furthermore the decrease of the intensities with increasing k indicates all the W atoms to be situated in one plane normal to the b axis, the symmetry of the W atom lattice thus containing a mirror plane.

Comparison with known oxide structures

In order to obtain a general idea of the spatial distribution of the atoms of the oxide the average radial distribution function $4\pi r^2\rho(r)$ as defined by GINGRICH and WARREN (4) was investigated. The $p|F|^2$ values included in the coefficients of this series were obtained from the photometrically evaluated intensities of the lines in focusing camera powder photographs of the preparation $\text{WO}_{2.90}$ (42 days, 1050°C) in the way described by HÄGG and REGNSTRÖM (5). Within the calculated interval, $1.5\text{ \AA} < r < 6.0\text{ \AA}$, the distribution function shows only two strong maxima interpretable as due to W-W interaction, viz. at $r = 3.8\text{ \AA}$ and $r = 5.4\text{ \AA}$ ($\approx 3.8\sqrt{2}$). This is in conformity with the distribution of a considerable number of the W atoms of the oxide in approximate accordance to the arrangement of the metal atoms of a structure of D0_9 -type (ReO_3 -type) (6). As a matter of fact two additional, relatively low peaks in the distri-

¹ In a paper by GLEMSEER and SAUER (3) considerably higher density values were reported for preparations of similar composition synthesized at 800°C .

bution function, occurring at $r \approx 2.0$ Å and $r \approx 2.7$ Å, might be interpreted, as far as they can be considered reliable, as connected with the W-O and O-O distances of such a structure. The view of WO_6 octahedra joined by sharing corners according to the D_{09} -scheme playing a very important rôle in the lattice of β -tungsten oxide elucidates the similarity of the powder photographs of this compound with those of tungsten trioxide, which according to BRÄKKEN (7) crystallizes with a distorted ReO_3 -structure.

An examination of the Weissenberg photographs gives suggestions in the same direction. In every doublet or triplet of reciprocal lattice points the one closest to the substructure lattice point corresponds to the reflection of highest intensity.

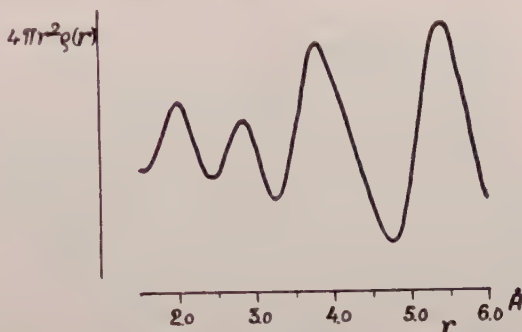


Fig. 2. The average radial distribution function. The two major maxima correspond to W-W distances. The two minor peaks occur where W-O and O-O interaction should give rise to maxima.

Furthermore, there is a steady decrease of the intensities of these strongest reflections with increasing Θ in the same way as for the spectra calculated for a D_{09} -structure.

It thus seems highly probable that β -tungsten oxide to a very large extent consists of a " D_{09} -lattice". However, there must exist a significant difference connected with the lower oxygen content of the actual compound in comparison with the ideal WO_3 lattice. A few different possibilities were considered concerning this question.

a) While γ -molybdenum oxide, Mo_4O_{11} , is to a considerable extent composed of MoO_6 octahedra joined by sharing corners, there are also certain Mo atoms which coordinate four O atoms only, the MoO_4 tetrahedra formed having their corners in common with those of octahedra (8). Due to the difficulty of combining tetrahedra with the arrangement of octahedra present in the β -tungsten oxide a somewhat similar arrangement seems improbable here.

b) It might be that the " D_{09} -lattice" contains vacant oxygen positions. The existence of compounds with an incomplete oxygen lattice was first established by SILLÉN and AURIVILLIUS (9) in a few double oxide systems, containing bulky metal atoms. These phases, having variable compositions, are characterized by the metal atom lattices stabilizing the structures. A similar arrangement does not seem very probable for the β -tungsten oxide, due to the small radius of the metal atom.

c) In previous investigations of oxides of molybdenum and tungsten a few phases have been shown to contain extensive parts of D_{09} -type, the oxygen deficit in comparison with the trioxides being connected with certain MeO_6 octahedra

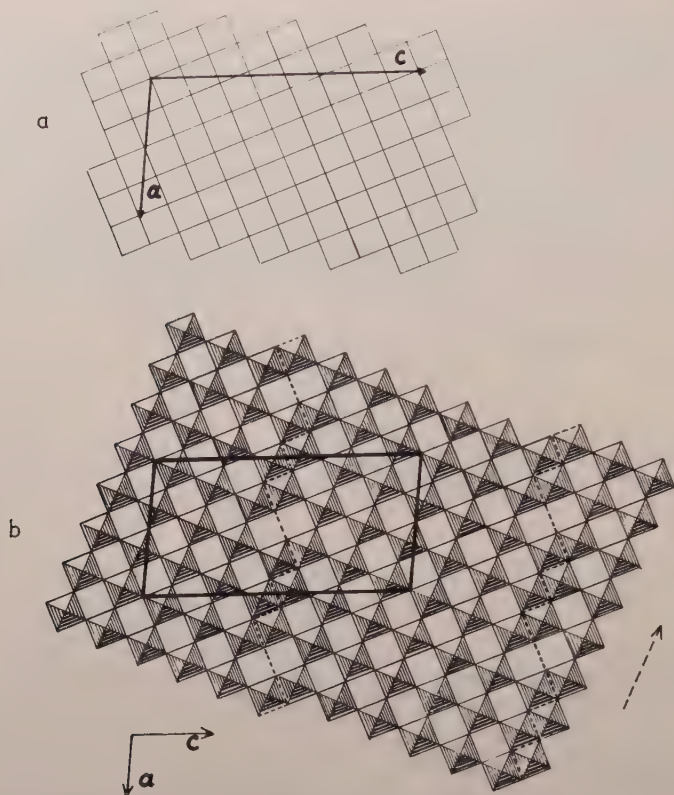


Fig. 3. a) The a and c axes of β -tungsten oxide indicated in the square network corresponding to the O positions of a (100) plane of a lattice of ReO_3 -type. The side of the square is equal to $3.75/\sqrt{2}$ Å. The mutual directions of the axes are those obtained from the reciprocal lattice (cf. Fig. 1). b) A hypothetical structure $\text{Me}_{20}\text{O}_{58}$ with almost exactly the same unit cell dimensions as β -tungsten oxide. The structure contains "blocks" of D_{09} -lattice (MeO_6 octahedra joined by sharing corners) with infinite extension in two dimensions. In the direction indicated by a dotted arrow the "blocks" have a characteristic width of twenty octahedra. The "blocks" are mutually connected by octahedra sharing edges. The projections of the folded planes common to the "blocks" are indicated by dotted lines. — This figure gives an idealized picture of the structure of β -tungsten oxide (v. infra).

sharing edges. This is the case for γ -tungsten oxide ($\text{W}_{18}\text{O}_{49}$) (10), β -molybdenum oxide (Mo_9O_{23}) and β' -molybdenum oxide (Mo_9O_{26}) (2). The octahedra of the γ -tungsten oxide are coupled together in a rather intricate way, whereas the molybdenum oxides may be described as consisting of "blocks" of deformed D_{09} -lattices with infinite extension in two dimensions and a characteristic width of eight and nine MoO_6 octahedra respectively in a third direction. The "blocks", being bounded by folded planes, are mutually connected by octahedra sharing edges. It was investigated how far a similar arrangement was compatible with known data concerning the β -tungsten oxide.

Fig. 3 a shows the a and c axes of β -tungsten oxide represented in the square network corresponding to the oxygen positions in a (100) plane of a lattice of ReO_3 -

type with the cube edge equal to 3.75 Å. The mutual directions of the various axes are those obtained from the reciprocal lattice. The elementary mesh of the β -oxide evidently fits very well with the ideal $D0_9$ -network. In Fig. 3 b complete MeO_6 octahedra have been introduced in such a way that the unit cell will contain twenty units $\text{MeO}_{2.90}$ ($=\text{Me}_{20}\text{O}_{58}$) and have the symmetry $P2/m$. The close agreement between the dimensions of this hypothetical structure and β -tungsten oxide is evident from the following figures:

	c/a	β
The structure according to Fig. 3 b	1.91	96°
β -tungsten oxide	1.93	95°

Tungsten positions

The highly regular pattern suggested above, however, cannot correspond exactly to the actual structure of β -tungsten oxide, as structure factors calculated on the basis of the former, although showing a splitting-up of the reflections compared

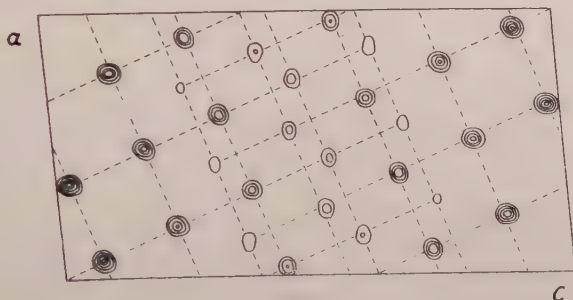


Fig. 4. Projection parallel to the b axis of the ρ function, $\rho(xz)$. The maxima are arranged on two interpenetrating systems of square networks, indicated by dotted lines. The level lines of the maxima are equidistant on an arbitrary scale with the level of the relatively smooth background roughly equal to zero.

with those of a $D0_9$ -structure, do not give agreement with the values experimentally derived. It was thus necessary to undertake a closer examination of the observed reflections.

As was pointed out above the regular decrease of the intensities of reflections hkl with increasing k shows all the W atoms to be situated in one plane normal to $[010]$. If, besides, the lattice is centrosymmetrical, i. e. of the symmetry $P2/m$, it seems highly probable that the signs of the structure factors of the strongest reflections are the same as those of the corresponding reflections of the basic $D0_9$ -lattice. The projection parallel to $[010]$ of the ρ function, $\rho(xz)$, was thus calculated¹, starting from the experimentally derived values of $\sqrt{F_{h0l}^2}$ with the signs computed for a $D0_9$ -lattice, the origin being chosen as in Fig. 3 b, halving the connection line between adjacent metal atoms². The diagram obtained in this way shows

¹ The Fourier summations were facilitated by using the rapidly working HÄGG-LAURENT machine (11) and the ROBERTSON strips (12).

² The $\rho(xz)$ function calculated on the basis of signs corresponding to the origin being placed in the metal atom of the $D0_9$ -lattice is of a general appearance similar to that of the function mentioned above but contains twenty-one major maxima. It is not possible to derive a structure compatible with the composition $\sim\text{WO}_{2.9}$ from such an arrangement of W atoms.

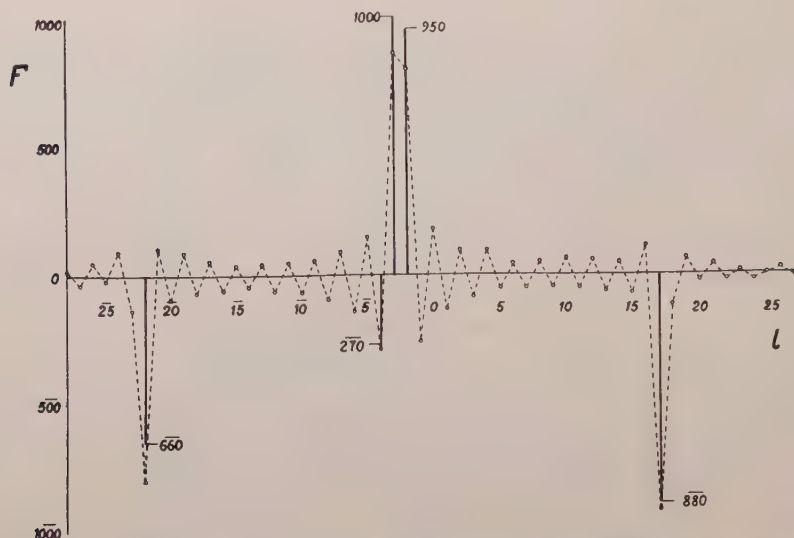


Fig. 5. Comparison between observed and calculated structure factors for reflections $30l$. The observed F values are indicated by heavy lines, the calculated ones are connected by dotted lines. The intensity of the reflection $30\bar{4}$ is at the limit of visibility in the Weissenberg photograph.

maxima corresponding to the metal atom positions of the structure model illustrated in fig. 3 b with certain changes of the coordinates, and in addition a number of extra peaks. Structure factors calculated on the basis of these revised metal atom positions are in fair agreement with the observed values. It was thus possible to repeat the calculation of $\rho(xz)$ utilizing all the observed $h0l$ reflections. The resulting map is illustrated in fig. 4, the function showing maxima arranged in two interpenetrating systems of square networks mutually related by the centrosymmetry of the figure. There is a steady decrease in the magnitude of the maxima of the systems with z increasing from 0 and decreasing from 1 respectively.

Structure factors calculated under the assumption that twenty W atoms are distributed in the unit cell, as are the twenty highest peaks in $\rho(xz)$, agree fairly well with the observed values. Fig. 5 illustrates a comparison for the reflections along the reciprocal lattice line $30l$, showing F to be very low except in the vicinity of the reciprocal lattice points of the substructure. Table 1 gives calculated and observed F_{h0l} values in these regions of F_{calc} , reaching considerable size. A few discrepancies may be due to the relatively low accuracy of the coordinate values caused by the small number of terms in the Fourier series and, to some extent, to the O atoms being neglected. Thus $F(0019)$ will change from 390 to 340 when the effect of O atoms arranged in the way given below is taken into consideration. Due to all the heavy metal atoms lying in one plane normal to $[010]$ the F values of reflections $h1l$ and $h2l$ will regularly be slightly less than the corresponding F_{h0l} values. This is in accordance with the observed data.

In order to make clear the nature of the extra maxima of the ρ projection this function was computed anew, but this time on the basis of the calculated structure factors of Table 1, omitting those smaller than the limit of visibility in the registered photograph (corresponding to about $F = 250$). The map obtained in this

Table 1.

Comparison between observed and calculated $|F|$ values for reflections $h0l$.
Weissenberg photograph with Cu-K radiation.

$h k l$	$\sin^2 \theta$	$ F _{\text{obs.}}$	$ F _{\text{calc.}}$	$h k l$	$\sin^2 \theta$	$ F _{\text{obs.}}$	$ F _{\text{calc.}}$
0 0 18	0.354	—	140	4 0 22	0.626	—	140
0 0 19	0.395	—	390	4 0 23	0.678	610	750
0 0 20	0.438	650	720	4 0 24	0.730	—	120
0 0 21	0.482	—	210	5 0 $\overline{12}$	0.238	—	220
1 0 $\overline{15}$	0.244	—	90	5 0 $\overline{11}$	0.214	940	960
1 0 $\overline{14}$	0.213	1140	1050	5 0 $\overline{10}$	0.193	200	300
1 0 $\overline{13}$	0.184	—	50	5 0 $\overline{9}$	0.174	—	100
1 0 4	0.023	—	180	5 0 8	0.187	—	100
1 0 5	0.033	370	460	5 0 9	0.208	1140	1040
1 0 6	0.045	1160	1140	5 0 10	0.229	—	120
1 0 7	0.061	—	270	6 0 $\overline{26}$	0.829	—	190
1 0 24	0.643	—	160	6 0 $\overline{25}$	0.776	310	670
1 0 25	0.697	600	610	6 0 $\overline{24}$	0.724	—	280
1 0 26	0.754	—	330	6 0 $\overline{6}$	0.173	—	20
2 0 $\overline{29}$	0.915	—	110	6 0 $\overline{5}$	0.163	1050	1110
2 0 $\overline{28}$	0.853	390	720	6 0 $\overline{4}$	0.156	—	50
2 0 $\overline{27}$	0.794	—	90	6 0 13	0.361	—	170
2 0 $\overline{10}$	0.118	—	130	6 0 14	0.392	530	440
2 0 $\overline{9}$	0.098	360	300	6 0 15	0.426	650	690
2 0 8	0.080	900	1130	6 0 16	0.462	—	200
2 0 $\overline{7}$	0.065	270	220	7 0 $\overline{20}$	0.586	—	50
2 0 $\overline{6}$	0.051	—	150	7 0 $\overline{19}$	0.546	650	830
2 0 9	0.112	—	160	7 0 $\overline{18}$	0.508	—	20
2 0 10	0.132	260	250	7 0 $\overline{1}$	0.198	—	190
2 0 11	0.156	1050	780	7 0 0	0.200	660	420
2 0 12	0.183	490	560	7 0 1	0.204	940	880
2 0 13	0.211	—	210	7 0 2	0.209	290	210
3 0 $\overline{23}$	0.591	—	140	7 0 3	0.218	—	140
3 0 $\overline{22}$	0.542	660	790	7 0 19	0.644	—	160
3 0 $\overline{21}$	0.496	—	110	7 0 20	0.690	600	640
3 0 $\overline{5}$	0.058	—	160	7 0 21	0.736	—	290
3 0 4	0.051	270	290	8 0 $\overline{14}$	0.435	—	270
3 0 3	0.044	1000	860	8 0 $\overline{13}$	0.409	650	790
3 0 $\overline{2}$	0.039	950	800	8 0 $\overline{12}$	0.385	—	150
3 0 $\overline{1}$	0.037	—	260	8 0 5	0.304	—	230
3 0 16	0.334	—	110	8 0 6	0.319	850	740
3 0 17	0.372	880	900	8 0 7	0.337	510	450
3 0 18	0.411	—	110	8 0 8	0.356	—	150
4 0 $\overline{18}$	0.391	—	210	9 0 $\overline{9}$	0.390	—	230
4 0 $\overline{17}$	0.356	510	540	9 0 $\overline{8}$	0.374	630	590
4 0 $\overline{16}$	0.321	610	650	9 0 $\overline{7}$	0.362	510	510
4 0 $\overline{15}$	0.289	—	180	9 0 $\overline{6}$	0.350	—	150
4 0 2	0.072	—	210	9 0 11	0.500	—	90
4 0 3	0.079	970	1160	9 0 12	0.529	660	820
4 0 4	0.089	—	250	9 0 13	0.559	—	70

Table 1 (contd.).

$h\ k\ l$	$\sin^2 \theta$	$ F _{\text{obs.}}$	$ F _{\text{calc.}}$	$h\ k\ l$	$\sin^2 \theta$	$ F _{\text{obs.}}$	$ F _{\text{calc.}}$
10 0 $\bar{3}$	0.408	—	140	12 0 $\bar{11}$	0.672	—	40
10 0 $\bar{2}$	0.406	630	860	12 0 $\bar{10}$	0.654	610	770
10 0 $\bar{1}$	0.406	—	140	12 0 $\bar{9}$	0.638	—	50
10 0 17	0.788	—	160	12 0 8	0.694	—	160
10 0 18	0.829	460	690	12 0 9	0.718	320	400
10 0 19	0.874	—	120	12 0 10	0.742	460	540
				12 0 11	0.770	—	150
11 0 $\bar{17}$	0.742	—	160	13 0 $\bar{6}$	0.701	—	160
11 0 $\bar{16}$	0.710	580	710	13 0 $\bar{5}$	0.694	480	350
11 0 $\bar{15}$	0.680	—	160	13 0 $\bar{4}$	0.690	600	600
11 0 3	0.517	—	120	13 0 $\bar{3}$	0.687	—	140
11 0 4	0.529	660	810	14 0 0	0.802	—	190
11 0 5	0.542	—	100	14 0 1	0.808	500	610
				14 0 2	0.816	—	310
				14 0 3	0.827	—	90

way is practically identical with the previous $\rho(xz)$ diagram, showing the same maxima with almost unchanged positions and heights. The extra peaks must thus be due to the termination of the series. The extremely pronounced effect in this case must be connected with the low number of reflections actually observed, the series not only being terminated at the surface of the limiting sphere but, due to the very thin crystals giving weak reflections, also within the registered part of the reciprocal lattice at short distance from each reciprocal lattice point of the substructure¹.

The investigation thus shows that the W atoms of the oxide are arranged according to the following scheme, the coordinate values being obtained from the electron density projection $\rho(xz)$:

Cell content: 20 W

Space group: $P2_1/m$

2 W ₁	in 2(n):	0.353	$\frac{1}{2}$	0.026
2 W ₂	in 2(n):	0.063	$\frac{1}{2}$	0.077
2 W ₃	in 2(n):	0.773	$\frac{1}{2}$	0.128
2 W ₄	in 2(n):	0.481	$\frac{1}{2}$	0.178
2 W ₅	in 2(n):	0.192	$\frac{1}{2}$	0.229
2 W ₆	in 2(n):	0.903	$\frac{1}{2}$	0.280
2 W ₇	in 2(n):	0.610	$\frac{1}{2}$	0.331
2 W ₈	in 2(n):	0.322	$\frac{1}{2}$	0.382
2 W ₉	in 2(n):	0.030	$\frac{1}{2}$	0.432
2 W ₁₀	in 2(n):	0.740	$\frac{1}{2}$	0.483

Due to the low number of terms in the Fourier series these coordinates may be relatively inaccurate.

¹ A note on this effect will be published elsewhere.

Oxygen positions

The W atom lattice arrived at is in close agreement with the one proposed in Fig. 3 b. The alterations in the positions of adjacent metal atoms are so small that the anticipated distribution of the O atoms fits in rather well with the derived structure. The O atoms are thus likely to be situated midway between adjacent W atoms except when bordering upon three metal atoms in which case certain displacements may be required in order to obtain reasonable interatomic distances. The following arrangement of the O atoms seems highly probable.

Cell content: 58 O

Space-group: $P2/m$

2 O ₁	in 2(<i>m</i>):	0.353	0	0.026
2 O ₂	in 2(<i>m</i>):	0.063	0	0.077
2 O ₃	in 2(<i>m</i>):	0.773	0	0.128
2 O ₄	in 2(<i>m</i>):	0.481	0	0.178
2 O ₅	in 2(<i>m</i>):	0.192	0	0.229
2 O ₆	in 2(<i>m</i>):	0.903	0	0.280
2 O ₇	in 2(<i>m</i>):	0.610	0	0.331
2 O ₈	in 2(<i>m</i>):	0.322	0	0.382
2 O ₉	in 2(<i>m</i>):	0.030	0	0.432
2 O ₁₀	in 2(<i>m</i>):	0.740	0	0.483
1 O ₁₁	in 1(<i>b</i>):	0	$\frac{1}{2}$	0
1 O ₁₂	in 1(<i>c</i>):	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
2 O ₁₃	in 2(<i>n</i>):	0.208	$\frac{1}{2}$	0.052
2 O ₁₄	in 2(<i>n</i>):	0.710	$\frac{1}{2}$	0.051
2 O ₁₅	in 2(<i>n</i>):	0.417	$\frac{1}{2}$	0.102
2 O ₁₆	in 2(<i>n</i>):	0.128	$\frac{1}{2}$	0.153
2 O ₁₇	in 2(<i>n</i>):	0.918	$\frac{1}{2}$	0.103
2 O ₁₈	in 2(<i>n</i>):	0.627	$\frac{1}{2}$	0.153
2 O ₁₉	in 2(<i>n</i>):	0.337	$\frac{1}{2}$	0.204
2 O ₂₀	in 2(<i>n</i>):	0.048	$\frac{1}{2}$	0.255
2 O ₂₁	in 2(<i>n</i>):	0.838	$\frac{1}{2}$	0.204
2 O ₂₂	in 2(<i>n</i>):	0.546	$\frac{1}{2}$	0.255
2 O ₂₃	in 2(<i>n</i>):	0.257	$\frac{1}{2}$	0.306
2 O ₂₄	in 2(<i>n</i>):	0.757	$\frac{1}{2}$	0.306
2 O ₂₅	in 2(<i>n</i>):	0.466	$\frac{1}{2}$	0.357
2 O ₂₆	in 2(<i>n</i>):	0.187	$\frac{1}{2}$	0.422
2 O ₂₇	in 2(<i>n</i>):	0.967	$\frac{1}{2}$	0.356
2 O ₂₈	in 2(<i>n</i>):	0.675	$\frac{1}{2}$	0.407
2 O ₂₉	in 2(<i>n</i>):	0.395	$\frac{1}{2}$	0.475
2 O ₃₀	in 2(<i>n</i>):	0.100	$\frac{1}{2}$	0.526

The accuracy of the coordinates of the O atoms may be comparable with that of the W atoms except for the O atoms belonging to edges common to WO_6 octahedra which are rather approximate.

Description and discussion of the structure

The lattice of β -tungsten oxide thus derived is represented in Fig. 6 showing the unit cell projected parallel to the b axis. Fig. 3 b gives an idealized picture of the structure illustrating how WO_6 octahedra sharing corners form large "blocks", mutually connected by certain octahedra sharing edges.

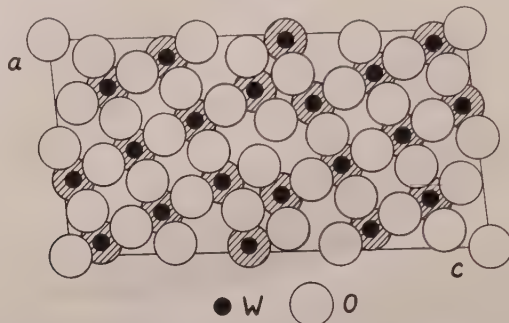


Fig. 6. The unit cell of β -tungsten oxide projected parallel to $[010]$. Atoms marked with lines are situated at $y = 0$, the other ones at $y = \frac{1}{2}$. Atoms at $y = 1$ are omitted.

In the actual structure the WO_6 octahedra exclusively sharing corners with other octahedra are regular or almost regular, while the other ones are deformed. The distances between W atoms of octahedra with corners in common are between 3.75 and 3.86 Å with an average value of 3.79 Å. This is in agreement with previously observed data, e. g. in the cubic sodium tungsten bronze (13). The distances between W atoms belonging to octahedra sharing edges are 3.28, 3.31, and 3.33 Å, and may be compared with corresponding distances in γ -tungsten oxide (3.31–3.44 Å) (10), and in β' - and β -molybdenum oxide (3.23–3.28 Å) (2). Very short W–W distances as occur in tungsten dioxide (14) and γ -tungsten oxide are not present in this oxide. The W–O distances of the regular WO_6 octahedra are about 1.90 Å while certain W–O distances of the deformed octahedra may be somewhat longer. Adjacent O atoms are always at least 2.6 Å apart.

The structure of β -tungsten oxide is related to those of β - and β' -molybdenum oxide but differs in regard to the width and the contour planes of the "blocks". In the tungsten oxide the "blocks" may be formally described as constructed of two-dimensional "boards", formed by WO_6 octahedra sharing corners, the "boards" having a finite extension of twenty octahedra, compared with the values of eight and nine for the molybdenum oxides. The groups of four octahedra sharing edges occurring in the latter compounds are here replaced by characteristic groups of six, due to the three extreme octahedra of both ends of each "board" sharing edges with the corresponding octahedra of other "boards".

It is worthy of note that the D_{0g} -lattice of β -tungsten oxide is almost regular while those of β - and β' -molybdenum oxide are highly distorted. This may be com-

pared with the structures of the trioxides, tungsten trioxide being of deformed DO_9 -type (7) and molybdenum trioxide crystallizing with quite another structure (7, 15). Tungsten thus seems more capable than molybdenum of forming a DO_9 -lattice. This is also of interest considering the non-existence of a molybdenum analogue of the highly stable sodium tungsten bronze of perovskite type, which may be at least formally described as an interstitial solution of alkali ions in a DO_9 -lattice (13).

Due to the characteristic extension of the large elements composing the structure, the "blocks", the formula $W_{20}O_{58}$ must be preferred to $W_{10}O_{29}$ for the composition of β -tungsten oxide.

The structure of β -tungsten oxide has certain features in common with the "step-lattice" of two complicated bismuth oxyhalides described by SILLÉN and EDSTRAND (16). The "blocks" of β -tungsten oxide are in the latter compounds reduced to "boards connected to form infinite flights of stairs through the lattice", the "boards", consisting of metal-oxygen sheets, being separated by single sheets of halogen atoms.

SUMMARY

The crystal structure of the blue β -tungsten oxide has been investigated by means of X-rays. The positions of the W atoms have been established from experimental data, whereas sites of the O atoms have been proposed from comparisons with known oxide structures and spatial considerations. The cell content determined in this way is $W_{20}O_{58}$, this formula being preferred to $W_{10}O_{29}$ for structural reasons. The lattice is built up of WO_6 octahedra coupled together by sharing corners and edges. The structure, being related to those previously determined for β - and β' -molybdenum oxide, may be described as consisting of "blocks" of WO_6 octahedra joined by sharing corners. The "blocks" are of infinite extension in two dimensions and of a characteristic width of twenty octahedra in a third direction. The "blocks" are mutually combined by octahedra sharing edges.

The author wishes to express his sincere gratitude to Professor G. HÄGG for his encouraging interest in the investigation. The work has been supported by a grant from the Swedish Natural Science Research Council, which is gratefully acknowledged.

Institute of Chemistry, University of Uppsala, October 1949.

- REFERENCES. 1. G. Hägg and A. Magnéli, Arkiv för Kemi etc. 19 A, No 2. 1944. — 2. A. Magnéli, Acta Chem. Scand. 2, 501. 1948. — 3. O. Glemser and H. Sauer, Z. anorg. Chemie 252, 144. 1943. — 4. N. S. Gingrich and B. E. Warren, Phys. Rev. 45, 762. 1934. — 5. G. Hägg and G. Regnström, Arkiv för Kemi etc. 18 A, No 5. 1944. — 6. Z. Krist. Strukturbericht 1928–1932. 1937. — 7. H. Bräkken, Z. Krist. 78, 484. 1931. — 8. A. Magnéli, Acta Chem. Scand. 2, 861. 1948. — 9. L. G. Sillén and B. Aurivillius, Z. Krist. 101, 483. 1939. — 10. A. Magnéli, Arkiv för Kemi 1, 223. 1949. — 11. G. Hägg and T. Laurent, J. Sci. Instr. 23, 155. 1946. — 12. J. M. Robertson, J. Sci. Instr. 25, 28. 1948. — 13. G. Hägg, Z. phys. Chemie (B) 29, 192. 1935. — 14. A. Magnéli, Arkiv för Kemi etc. 24 A, No 2. 1946. — 15. N. Wooster, Z. Krist. 80, 504. 1931. — 16. L. G. Sillén and M. Edstrand, Z. Krist. 104, 178. 1942.

Tryckt den 21 januari 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



The configuration at C_1 in (+)-camphor

By JERKER PORATH

With 3 figures in the text

In 1941 W. HÜCKEL gave a survey of the sterical relationship of terpenes and terpenoid compounds (1). He selected camphor as a reference substance. Of course there is particular interest in establishing positive relationships between this system and the more general system of glyceraldehyde. Some years ago FREDGA and MIETTINEN were able to show that (+)-isopropylsuccinic acid could be obtained as a degradation product from (–)- α -isopropylglutaric acid (2). Oxidation of (–)-fenchon yields among other substances the acid last-mentioned and thereby the configuration at C_4 of dextrorotatory camphor is determined.

FREUDENBERG called attention to the fact that the determination of the configuration at C_1 in (+)-camphor is reduced to the establishment of the sterical relationship between camphoronic acid and glyceraldehyde (3), due to the configuration at C_1 being unchanged during the oxidation of camphor to camphoronic acid. The following is intended to show how this connection can be obtained by the degradation of (–)-camphoronic acid to substances of known configuration. This determination gives a more direct connection between camphor and the FISCHER system.

On oxidation with concentrated nitric acid (+)-camphor gives (–)-camphoronic acid. Several methods were tried to substitute hydrogen for the carboxylic group at the carbon atom ③ in camphoronic acid (I) without attacking the asymmetric carbon atom ②. The only practicable way, illustrated by chart 1, seems to be the following.

The barium camphoronate was treated with ethanol saturated with hydrogen chloride. The diethyl camphoronate formed was precipitated as its silver salt, which on treatment with bromine according to HUNSDICKER and HUNSDICKER (4), yielded the bromoester. Reduction by means of zinc and acetic acid and subsequent treatment with hydrochloric acid yielded a hydrolysate. From this were isolated both (+)- β -methylterebic acid (V) and (–)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid. The yield was rather poor, probably because diethyl camphoronate is a mixture of II, II a, and II b. However the degradation from camphoronic acid was repeated, yielding the same final products. The amount obtained was quite sufficient for the identification of both the acids. No degradation products from II a and II b have been isolated.

The sterical relationship between (–)-malic acid (VIII) and (–)-glyceraldehyde is established by means of pure chemical methods. In order to connect sterically malic acid to methylsuccinic acid (XI) FREDGA used a method, earlier

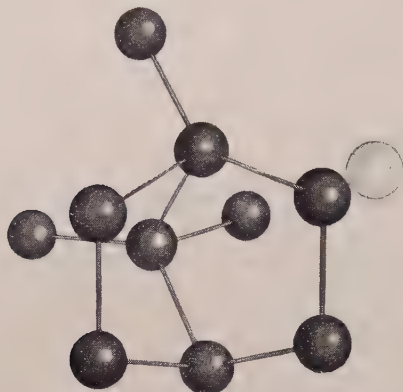


Fig. 1. (+)-Camphor.

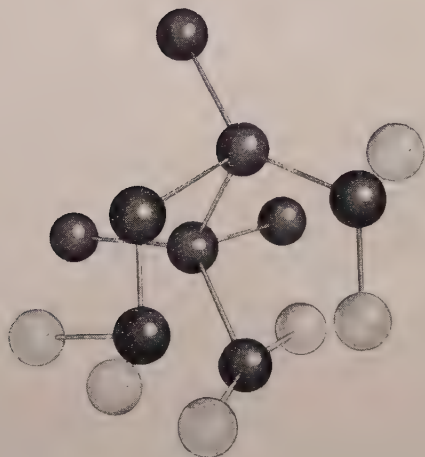
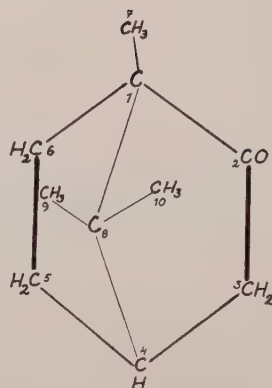


Fig. 2. (-)-Camphoronic acid.

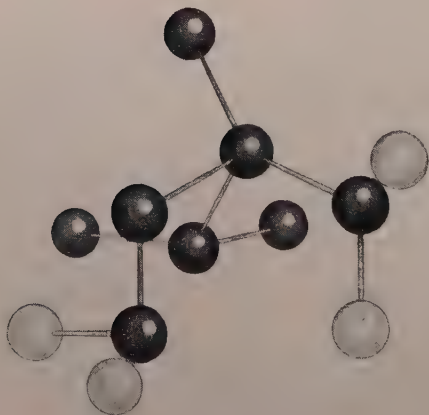
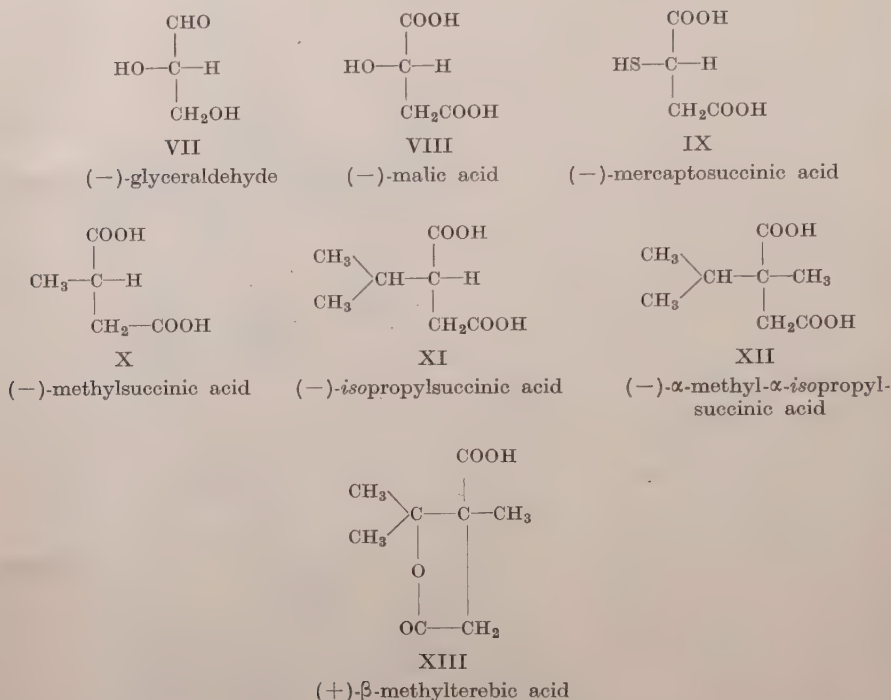


Fig. 3. (-)-α-methyl-α-isopropylsuccinic acid.

Chart 2



not so frequently employed, for determinations of sterical relationships (5), »the melting point curve method». By means of melting point diagrams he also connected isopropylsuccinic acid to methylsuccinic acid (2), (6). The configurations of the optical antipodes of α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and β -methylterebic acid were determined (7). As far as is known these are the first alifatic compounds with quaternary asymmetric carbon atom which have been connected to the system of glyceraldehyde. These acids were also obtained in active forms from (+)-camphor. The different steps from (-)-glyceraldehyde to (+)- β -methylterebic acid are schematically shown in chart 2.

The correspondence between (+)-camphor, (-)-camphoronic acid and (-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid is obvious from figs. 1–3 (the hydrogen atoms are omitted for simplification). C₁ and C₄ are situated in the plane of the paper, C₂, C₃, C₅, and C₆ above and C₇, C₈, C₉, and C₁₀ below that plane. Apparently fig. 3 and (XII) are identical. The result is evidently in agreement with the opinion of FREDGA and MIETTINEN, because the determinations of the configurations at C₁ and C₄, both issuing from isopropylsuccinic acid, show that, choosing FISCHER's system, *the bridge is below the plane of the paper*. Moreover, the results of both these investigations show that *the bridge must be formed by cis-valencies* in accordance with the strain theory, and also confirmed by X-ray analysis (8). If FISCHER's system is shown to be correct the positions of the spheres in fig. 1 must represent the correct spatial arrangement of the corresponding atoms in (+)-camphor.

Experimental

(—)-Camphoric acid

Camphoric acid was obtained from pure (+)-camphor on oxidation with concentrated nitric acid, according to GOEBEL and NOYES (9). M. p. 156–157°.

0.9618 g acid dissolved in water to 10.00 ml:

$$2 \alpha_D^{25} = -5.08^\circ \quad [\alpha]_D^{25} = -26.4^\circ$$

The silver salt of diethyl camphoronate

50 g camphoric acid dissolved in 200 ml hot water was neutralized with hot barium hydroxide solution. The precipitate was filtered hot. 50 g dried barium camphoronate was suspended in 200 ml alcohol. After cooling with ice the solution was saturated with hydrogen chloride. After four days the barium chloride was filtered off by means of a porcelain filter. The filtrate was evaporated over a boiling water bath until no more hydrogen chloride could be detected. The residue was treated with sodium carbonate solution and ether, the neutral ester passing into the ether phase. The water solution was acidified with dilute sulphuric acid and the hydrogen esters were extracted with ether. After evaporation of the ether the oily residue was neutralized with sodium carbonate. Silver nitrate solution was added in excess. After half an hour in darkness the solution was filtered by suction. The silver salt was dried in a vacuum desiccator kept in darkness. The salt thus dried was slightly brown-coloured.

Analysis 0.1175 g salt: 0.0335 g Ag

Ag found 28.5; calc. for $C_{13}H_{21}O_6$ Ag 28.3

Apparently the hydrogen ester consisted mainly of diethyl camphoronate.

Conversion of the silver salt into bromoester, and subsequent reduction and hydrolysis yielding the acids A and B

9.5 g dried silver salt was suspended in 7 ml dry carbon tetrachloride. Dry bromine was slowly added on cooling and vigorously stirred until no more bromine was decolourised. The solution was heated over a steam bath for half an hour. The silver bromide was filtered off and thoroughly washed with carbon tetrachloride. The combined filtrate and wash-solution were evaporated.

The residue was dissolved in 10 ml ethanol. Water was added drop by drop until the solution became turbid and then a small portion of alcohol was carefully added barely enough to clear the solution. 10 ml glacial acetic acid and 3 g zinc filings were added, heat being evolved. The mixture was refluxed for four hours. The alcohol was distilled off. 10 ml of a mixture of equal parts of concentrated hydrochloric acid and water were added and after another four hours' refluxing, most of the acid was distilled off. The residue was extracted with three portions of ether. The ether was evaporated and the crystal mass dissolved in 5 ml water. After a few days refrigeration the separated crystals were collected. The yield was about 0.05 g. These crystals consisted

of an acid A, the identification of which is described below. The mother liquor was made slightly alkaline by ammonia and a solution of calcium chloride was added. The calcium salt precipitated was treated with hydrochloric acid. Extraction with ether, evaporation of the ether and recrystallisation of the residue from a small amount of water yielded about 0.1 g of an acid B.

The identification of A and B

The acid A crystallised from water in white needles of the same shape as those of β -methylterebic acid. It was very soluble in hot water, acetone, ethyl acetate and ethanol but slightly so or almost insoluble in cold water, ligroin and benzene in full accordance with the properties of β -methylterebic acid. The acid A melts at 218–220° evolving a gas (probably carbon dioxide). All these facts indicate that A is active β -methylterebic acid. In order to obtain the sign of the rotatory power the melting points of some mixtures of A and the synthetic antipodes of β -methylterebic acid were determined. The determinations of the melting points were made by means of an electric hot plate and a microscope. The melting points depend on the rate of heating. The samples appearing together in tables 1 and 2 were heated simultaneously.

Table 1

	Proportion	M. p.
(+)- β -methylterebic acid		217–219°
(+)- β -methylterebic acid and A.....	10:1	216–219°
(+)- β -methylterebic acid and A.....	1:1	214–217°
(-)- β -methylterebic acid		217–219°
(-)- β -methylterebic acid and A.....	10:1	215–217°
(-)- β -methylterebic acid and A.....	1:1	203–204°
racemic β -methylterebic acid		204–205°

There is no doubt that A is identical with the dextrorotatory β -methylterebic acid.

Both B and α -methyl- α -isopropylsuccinic acid are easily soluble in hot water, acetone, chloroform, boiling benzene, ethyl acetate and ethanol but only moderately soluble in cold water and cold benzene and very slightly soluble in ligroin. M. p. 123–124°.

The acid was titrated potentiometrically.

0.00441 g acid: 5.45 ml 0.0094-N NaOH

E. W. found 86; calc. for methylisopropylsuccinic acid 87.1

As in the former case the melting points were determined by means of an electric hot plate. The temperature at which the last traces of the crystals disappeared was recorded as the melting point. The corresponding melting points obtained from the melting point diagram for mixtures of the antipodes of α -methyl- α -isopropylsuccinic acid are given in the last column.

Table 2

	Proportion	M. p.	M. p. from the diagram
(-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid		125°	
(-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and B	10:1	124.5°	
(-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and B	1:1	124.0°	
(+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid		126.0°	127.0°
(+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and B	10:1	120.0°	121.0°
(+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and B	2:1	138.0°	139.5°
(+)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid and B	1:1	146.0°	148.5°

B and (-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid are apparently identical. A strong argument for this is that the combination of B and the laevorotatory acid melts 20° higher than the components and about at the melting point of the racemic mixture.

SUMMARY

(-)-Camphoronic acid has been degraded to (+)- β -methylterebic acid and (-)- α -methyl- α -isopropylsuccinic acid. A direct connection of camphor to the FISCHER system is thus obtained. The FISCHER system and the HÜCKEL system (with the bridge in (+)-camphor above the plane of the paper) are contrary to each other. The directional distributions of the valencies obtained from the determinations of the configurations at C₁ and C₄ show that the bridge must be formed by *cis*-valencies, as earlier assumed from geometrical reasons.

The author takes this opportunity of expressing his gratitude to Professor ARNE FREDGA for his valuable advice and help. The expenses incurred by this investigation were defrayed by a grant from the Nobel Fund of the Royal Swedish Academy of Sciences (Kemiska prisgruppens särskilda fond).

Organic Department, Chemical Institute, University of Uppsala, November 1949.

REFERENCES: 1. W. Hüchel, J. prakt. Chem. 157, 225 (1941). — 2. A. Fredga and J. Miettinen, Acta Chem. Scand. 1, 371 (1947). — 3. K. Freudenberg, Stereochemie, 688, Leipzig and Wien, 1933. — 4. H. Hunsdicker and Cl. Hunsdicker, Ber. 75, 291 (1942). — 5. A. Fredga, »The Svedberg 1884 ³⁰/_s 1944», 261 (Uppsala 1944). — 6. A. Fredga and E. Leskinen, Arkiv f. Kemi, Min. o. Geol., Bd 19 B, N:o 1 (1945). — 7. J. Porath, Arkiv f. Kemi, Bd 1, N:o 36 (1949). — 8. E. H. Wibenga and C. J. Kron, Rec. trav. chim. 65, 663 (1946). — 9. W. Goebel and W. Noyes, J. A. C. S. 45, 3066 (1923).

Tryckt den 4 februari 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Preparation and properties of adrenocorticotropically active peptides (ACTH peptides)

By CHOH HAO LI¹ and KAI O. PEDERSEN

With 4 figures in the text

It is now well established that the hormones isolated from the anterior lobe of hypophysis are protein in nature (1). Thus far there are no indications of the existence of a prosthetic group or groups responsible for the biocatalytic action in these hormones. Evidences rather suggest that the structural make-up of the whole molecule is necessary for its physiological role. Enzymic, acid or alkali hydrolysis destroys the biological activities of these protein hormones except in the case of adrenocorticotropic hormone (ACTH).

The adrenocorticotropic hormone is a protein of molecular weight about 20 000 and has an isoelectric point at pH 4.70. The hormone contains 15.65 per cent nitrogen and 2.3 per cent sulfur; the sulfur content may be accounted for by 1.93 per cent methionine and 7.19 per cent cystine (1).

One of the unusual properties of the adrenocorticotropic hormone is its resistance to heat treatment. A neutral solution of the hormone retains its biological potency after being kept at boiling-water temperature for 120 minutes or longer (1). Even more remarkable is the fact that the hormone remained active after certain pepsin digestions (2). The hormonal activity was conclusively demonstrated to reside in the hydrolyzed fragments (peptide residues) of the original protein molecule. It is the purpose of this paper to present certain physico-chemical properties of the ACTH peptide preparations.

Method of preparation. The adrenocorticotropic hormone was isolated from sheep glands by the procedure previously described (3). The hormone appears to be a homogeneous protein as examined in electrophoresis, ultracentrifuge and solubility studies. Approximately 10 mg of a commercial pepsin preparation (Lily) was dissolved together with 100 mg of the pure hormone in 20 cc 0.05 M-HCl solution; the mixture was kept at 37.4° C for 4 to 5 hours and then at 80° C for 3 minutes to destroy the peptic activity. In every case, it was found that the hormone was digested to the extent of about 50 per cent as determined by the nitrogen in the trichloroacetic acid supernatant. When the trichloroacetic acid supernatants were assayed in hypophysectomized female rats, results indicated that they contained the adrenocorticotropic activity (2).

¹ On sabbatical leave from the University of California, Berkeley, California. John Simon Guggenheim Memorial Foundation Fellow 1949–1950. Part of the experiments presented herein was carried out at the University of California.

Table 1

Bioassay of fractions from pepsin hydrolysis of ACTH by ascorbic-acid-depletion method.

Fraction	Dose in nitrogen per 100 g rats, microgram	Ascorbic acid lowering per 100 g adrenals, mg	ACTH standard equivalent per microgram N, microgram
L1642M-original ACTH protein	0.75(4) ²	116 (101—135) ³	1.0
L1669CS-TCA ¹ soluble material	0.597(6)	121 (98—151)	1.5
L1669CP-TCA insoluble material	0.705(5)	86 (62—138)	0.3

¹ TCA = Trichloroacetic acid.

² Number of rats in parenthesis.

³ Range of changes is parenthesis.

An alternative method for the preparation of the active peptic hydrolysate of ACTH employs the crystalline enzyme. One gram of ACTH protein and 40 mg crystalline pepsin were dissolved in 100 cc of 0.10 M-acetic acid and kept at 37.4° C. At the end of 17 hours, the enzyme action was stopped by putting the mixture into an 80° C water bath for 5 minutes. Seventeen cc of 30 per cent trichloroacetic acid was then added; the precipitate formed was removed by centrifugation. The supernatant was extracted with ether repeatedly until it was freed from trichloroacetic acid. The non-protein fraction was then frozen and dried in vacuum. A typical assay data of this material as obtained by the ascorbic-acid-depletion method (4) may be seen in Table 1. It is clear that the trichloroacetic acid soluble fraction is highly active whereas the remaining protein residue contains practically no potency. This adrenocorticotropically active non-protein material has been employed for physico-chemical and clinical investigations; it is hence designated as ACTH peptides.

Table 2

Relative peptide length (average amino acid residues) of the ACTH peptides from pepsin digests.

Degree of digestion, %	Total N of hydrolysate, mM	NH ₂ -N, mM	N in peptides, mM	Average peptide length
48	1.04	0.111	0.830	7.5
48	1.09	0.099	0.865	8.7
50	1.07	0.093	0.850	9.1
51	1.07	0.113	0.850	7.5

It should be mentioned that if the peptic hydrolysis was extended to 60 per cent, a definite destruction of the hormonal activity was evident. Other enzymes have been investigated and it was found that the ACTH activity was destroyed by trypsin, chymotrypsin and papain digestions. As shown earlier (2), certain HCl hydrolysates of the hormone also retained adrenocorticotropic potency.

Relative size of ACTH peptides. The ACTH peptides do not contain free amino acids as indicated by the gasometric amino acid carboxyl determinations (5). It was found by the nitrous acid method of VAN SLYKE (6) that approximately 10 per cent of the total nitrogen in the peptides is free amino nitrogen. As previously reported (7), the complete hydrolysates of ACTH contained 6.5 per cent of the total nitrogen as amide nitrogen and 79.4 per cent of the total nitrogen minus the amide nitrogen as the amino nitrogen. With these data, it was computed that the average peptide length in the ACTH peptides varies from 7 to 9. The data are shown in Table 2.

Average molecular weight. In order to estimate the average molecular weight (M) of the peptides, we employed the well-known Svedberg formula

$$M = \frac{RTs}{D(1 - V\rho)} \quad (1)$$

where s is the sedimentation constant, V the specific volume, D the diffusion constant, ρ the density of the solvent, R the gas constant and T the absolute temperature. Since the peptides may be very heterogeneous and since the average s value may be low, it appears advantageous to obtain an idea of the polydispersity of the mixture from diffusion experiments.

A 0.4 per cent aqueous solution of the ACTH peptides was allowed to diffuse against pure water in a Claesson diffusion cell (8) at 20.00° C. The concentration gradient was followed by means of the Lamm scale method (9). The experiment was completed in less than six hours. The »height-area» method gave $D_A = 28.5 \times 10^{-7}$ (c. g. s. units), whereas from the method of »second moment» $D_m = 33.5 \times 10^{-7}$. Another diffusion experiment with a 0.5 per cent aqueous solution of the peptides resulted in $D_A = 30.0 \times 10^{-7}$ and $D_m = 33.6 \times 10^{-7}$. The difference between D_A and D_m indicates that the peptide mixture contains components with different diffusion constants. For a monodisperse substance we have $D_A = D_m$.

From a comparison of the »ideal diffusion curve» and the normalized diffusion curve (Fig. 1) calculated from four exposures of the second diffusion experiment, it is also evident that the peptide mixture contains molecules of different sizes. Since the deviation of the experimental diffusion curve from the ideal curve was not too great, it seems worth while to make a sedimentation run in the oil-turbine ultracentrifuge.

In the first experiment a 1.95 per cent solution of the ACTH peptide was run in the ultracentrifuge at 59 000 r. p. m. for 370 min. During the run the temperature of the rotor increased gradually from 21.1° C to 21.5° C. As in the case of the peptides D is so high and s is so small that the »peak» never gets free from the meniscus, s_{20} cannot be calculated in the usual way, but it may be done in a way similar to one earlier described by one of us (10). In our experiments the observation of the concentration distribution in the cell was made with the Lamm scale method (9).

The $\left(\frac{dc}{dx}, x\right)$ diagrams showed that at the exposure taken 190 min. after reaching full

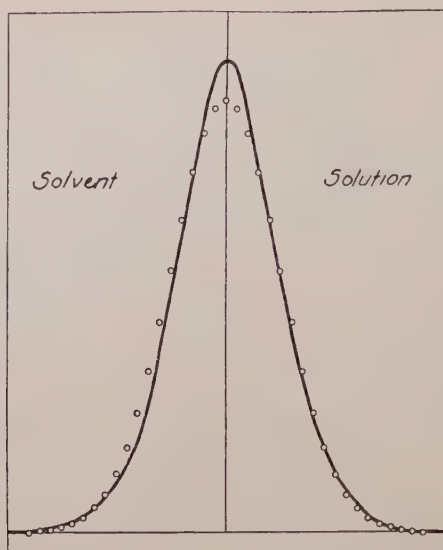


Fig. 1. Normalized diffusion curves. The heavy curve is drawn through the point calculated from exposures taken 144, 156, 172, and 226 minutes after the formation of the diffusion boundary. In case the solution had contained molecules all having the same size it should have passed through all the circles, which gives the shape of the ideal diffusion curve.

Table 3

Estimated average molecular weights for ACTH peptides for different values of V_{20} .

$s_{20} \times 10^{13}$	$D_{20} \times 10^7$	V_{20}	M	f/f_0
0.45	30.0	0.75	1450	(0.94)
		0.72	1300	(0.99)
		0.70	1210	1.02
		0.68	1140	1.05

speed there was still a small part in the cell where $\frac{dc}{dx} = 0$. The sedimentation diagrams from this and earlier exposures were therefore successively integrated from the »constant part» to the meniscus whereby a (c, x) diagram was obtained which was finally corrected for the dilution effect due to the sector shape of the cell and the increase in the centrifugal field with x . The rest of the procedure was carried out as described (10). Fig. 2 gives a plot of $\log x$ against time, where x is the calculated position of the »ideal boundary» (where $D = 0$). The sedimentation constant is calculated in the usual way from the slope of the line. The first experiment gave $s_{20} = 0.44 S$. Two further experiments with 1.5 and 2 per cent solutions both gave $s_{20} = 0.46 S$.

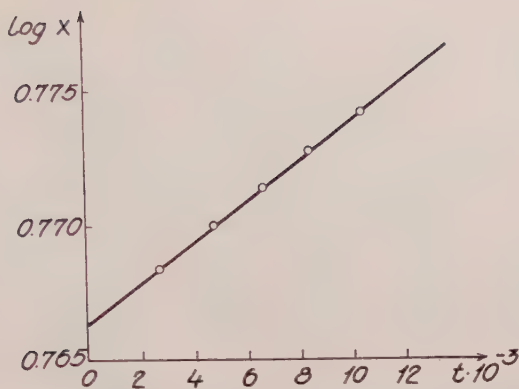


Fig. 2. Sedimentation of the ACTH peptides in the ultracentrifuge. The variation of the calculated position x for the "ideal boundary" with time.

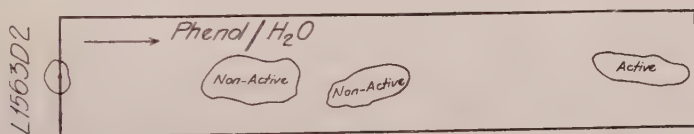


Fig. 3. A paper chromatography of ACTH peptide preparation in phenol/ H_2O .

For the calculation of M from equation (1), the value of D_A is probably the most correct one to use as we are interested in getting a »weight average» molecular weight. In the case of V , we have not yet determined it on account of the limited supply of the peptides, but it is reasonable to assume a value of V somewhat in the neighborhood of 0.70. Taking $D_{20} = 30.0 \times 10^{-7}$ and $V = 0.70$, M is probably less than 1280. In Table 3, we have tabulated the calculated M using $s_{20} = 0.45 S$, $D_{20} = 30.0 \times 10^{-7}$ and different values of V_{20} . Since the frictional constant, f/f_0 is always greater than unity, we assume that V must be less than 0.72. The average molecular weight of the ACTH peptides is therefore less than or equal to 1 200.

Certain chemical properties. A complete hydrolysate of the ACTH peptides has revealed the following amino acids on two-dimensional paper partition chromatography (11) using lutidine/ H_2O and phenol/ H_2O as the solvents: aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, serine, glycine, threonine, alanine, tyrosine, histidine, valine, tryptophane, proline, leucines, and phenylalanine. Quantitative analysis of tyrosine and tryptophane content by the method of LUGG (12) showed that the peptides contain 1.0 per cent tryptophane and 1.5 per cent tyrosine.

The peptides are very soluble in water. The biological activity of a neutral solution is stable after being kept at 100°C for 2 hours. However, it is destroyed by further hydrolysis with 6 N-HCl at 37.4°C .

Preliminary chromatographic studies. The peptides may be separated into a number of components on paper partition chromatography using either 10 per cent acetic acid-butanol/ H_2O or phenol/ H_2O as the solvent. The acetic acid-butanol/ H_2O was prepared according to PARTRIDGE (13); Whatman No. 4 paper was used. Results

Table 4

Bioassay of peptide fractions obtained in paper¹ by ascorbic-acid-depletion method.

Fraction	N distribution, %	Dose in nitrogen per 100 g rats, microgram	Ascorbic acid lowering per 100 g adrenal, mg	ACTH standard equivalent per microgram N
L1563 D2-original peptides	100	0.75(4) ²	125 (105—139) ³	1.4
“Active Spot”	18	0.81(6)	142 (103—176)	18.6
Remainder of the paper	72	3.24(8)	3 (+ 21 to -51)	0

¹ Using phenol/H₂O as the solvent.

² Number of rats in parenthesis.

³ Range of changes in parenthesis.

indicated that the peptides contain at least 6 distinct spots after being developed by ninhydrin solution. It was found that one of these spots was highly active in adrenalstimulating potency as assayed by the ascorbic acid-depletion method in hypophysectomized rats. Similar experiments using phenol/H₂O resulted only in 3 ninhydrin spots (Figure 3). The spots were cut out and eluted with water; the resultant solutions were assayed for the adrenocorticotropic activity. As shown in Table 4, one of the spots is highly active. It is evident from such limited assay data that the active spot is approximately 13 times more active than the original peptide mixture.

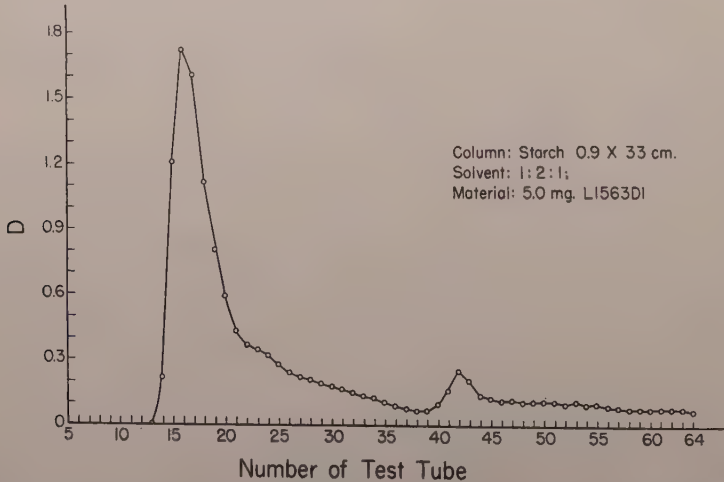


Fig. 4. Chromatographic separation of ACTH peptides in a starch column. Solvent, 1:2:1, 0.1 N HCl-n-propanol-n-butanol; column, 0.9 x 33 cm. 5.0 mg of the peptides was used.

The starch column chromatography of STEIN and MOORE (14) was also employed for the fractionation of the ACTH peptides. The dimensions of the starch column were 0.9×33 cm. The eluent was a mixture consisting of 1 part of 0.1 N-HCl, 2 parts of n-propanol, and 1 part of n-butanol. A typical experiment using 5.0 mg of ACTH peptides may be seen in Figure 4. Each test tube contained 0.5 cc eluent; the ordinate of the Figure was plotted from the optical density of the ninhydrin color as carried out by the technique of MOORE and STEIN (15). When the fractions were assayed, the first fraction collected from Tubes No. 15 to 20 was found to contain most part of the adrenocorticotropic activity. We are not certain, however, of the purity of this fraction. The fact that similar peptides were obtained by BOR-SOOK et al. (16) from livers of different animals suggests that our adrenocorticotropically active peptide fraction obtained from the starch column must contain a mixture of peptides.

Parts of the expenses connected with this investigation were defrayed by grants from The Swedish Medical Research Council and The Swedish Natural Science Research Council.

SUMMARY

Methods for the preparation of adrenocorticotropically active peptide mixture (ACTH peptides) have been described. The average peptide size and molecular weight of the peptides have been determined. It was found that the ACTH peptides consist of 7 to 9 amino acid residues and the average molecular weight as determined by diffusion and ultracentrifugal experiments must be less than or equal to 1200. Preliminary chromatographic fractionations of the peptides in starch and paper are presented. Certain chemical properties of the ACTH peptide mixture are also discussed.

Institutes of Biochemistry, and Physical Chemistry, University of Uppsala, Sweden.

REFERENCES: 1. Li, C. H., *Ann. Rev. Biochem.* 16, 291 (1947). — 2. Li, C. H., *Transactions of Macy Conference on Metabolic Aspects of Convalescence* (Josiah Macy Foundation) 17, 114 (1948). — 3. Li, C. H., M. E. Simpson and H. M. Evans, *Science* 96, 450 (1942); *J. Biol. Chem.* 149, 413 (1943). — 4. Sayers, M. A., G. Sayers and L. A. Woodbury, *Endocrinology* 42, 379 (1948). — 5. Van Slyke, D. D., R. T. Dillon, D. A. Mac Fadyen and P. Hamilton, *J. Biol. Chem.* 141, 629 (1941). — 6. Van Slyke, D. D., *J. Biol. Chem.* 83, 425 (1929). — 7. Li, C. H., *Federation Proceeding* 8, March (1949). — 8. Claesson, S., *Nature* 158, 834 (1946). — 9. Lamm, O., *Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsal.* IV, 10 (1937) No. 6. — 10. Svedberg, T., and K. O. Pedersen, *The Ultracentrifuge*, Oxford Press, 1940. Pp. 283. — 11. Consden, R., A. H. Gordon and A. J. P. Martin, *Biochem. J.* 38, 224 (1944). — 12. Lugg, J. W. H., *Biochem. J.* 32, 775 (1937). — 13. Partridge, S. M., *Biochem. J.* 42, 238 (1948). — 14. Stein, W. H. and S. Moore, *J. Biol. Chem.* 176, 337 (1948). — 15. Moore, S. and W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 176, 367 (1948). — 16. Borsook, H., C. L. Deasy, A. J. Haagen-Smit, G. Keighley and P. H. Lowy, *J. Biol. Chem.* 179, 705 (1949).

Tryckt den 2 februari 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über die Fortpflanzungsfähigkeit fettreich ernährter Ratten bei Eingabe von Wachstumsstoffen

Von BETH VON EULER, HANS VON EULER und GRETA LINDEMAN

In einer 1945 begonnenen¹, seither an einem umfassenden Tiermaterial fortgeführten und z. T. veröffentlichten² Untersuchung über den Einfluss des Nahrungsfettes auf das Wachstum, die Fruchtbarkeit und die Lebensdauer von Ratten wurden alle bis jetzt für diese Tiere als lebenswichtig erkannten fett- und wasserlöslichen Vitamine zugegeben, sodass nicht nur eine gute Gewichtszunahme, sondern auch ein befriedigender Gesundheitszustand der Ratten, und zwar, bis zu dem verhältnismässig hohen Alter von über 2 Jahren erreicht wurde.

Allerdings kam die dabei festgestellte Gewichtszunahme und Fortpflanzungsfähigkeit der Ratten noch nicht derjenigen gleich, die bei der Verabreichung gemischter Kost ad libitum erzielt wird. Wenn aus diesem Umstand auch nicht bindend geschlossen werden darf, dass in der angewandten Kost wesentliche, noch unbekannte Nahrungsfaktoren von Vitamincharakter gefehlt haben, so ist es doch eine wichtige Aufgabe von praktisch weittragender Bedeutung, den Einfluss verschiedener, mengenmässig unbedeutender Zusätze auf einzelne biologische Funktionen, besonders auf die Fortpflanzungsfähigkeit zu untersuchen. In erster Linie wollten wir in die an der Fortpflanzung beteiligten, bis jetzt noch unzureichend erkannten Stoffwechselvorgänge und in das Zusammenwirken der hormonalen Fortpflanzungsfaktoren (Sexualhormone) mit Vitaminen einen näheren Einblick gewinnen.

Nachdem gezeigt war, dass das Wachstum von Ratten durch Zusatz des A-Vitamins und der zuerst entdeckten Vitamine der B-Gruppe B₁ und B₂ einige Zeit aufrecht erhalten werden kann, hat die weitere Forschung ergeben, dass ausserdem noch eine Anzahl von fett- und wasserlöslichen Wirkstoffen für andauerndes Wachstum notwendig oder jedenfalls für die Erreichung der normalen Geschwindigkeit der Entwicklung von Bedeutung ist. Es braucht diesbezüglich nur an den Einfluss von Aminosäuren, Ketosäuren und Oligometallen erinnert zu werden.

Wie in Arbeiten aus diesem Institut schon mehrmals hervorgehoben wurde, ist Wachstum (Gewichtszunahme per Zeiteinheit) die Resultante vieler primärer, von Vitaminen beeinflusster Vorgänge, die sich einzeln biochemisch, physiologisch und morphologisch genauer definieren lassen. Eine nähere Untersuchung dieser Teilvorgänge würde zweifellos ihre Abhängigkeit von weiteren, als Wirkstoffe noch nicht erkannten Substanzen zeigen. Insbesondere dürfte dies bezüglich der an der Fortpflanzung beteiligten Prozesse gelten.

¹ B. v. EULER, H. v. EULER und I. RÖNNESTAM, Dieses Arkiv 22 A N:o 8 (1945/46).

² B. v. EULER, H. v. EULER und I. RÖNNESTAM, Dieses Arkiv 24 A N:o 15 und N:o 20 (1946/47).

Bereits in den ersten Perioden der Vitaminforschung und in Zusammenhang mit der Entdeckung der Vitamine E (Tocopherole) durch H. M. EVANS¹ und seine Mitarb. K. S. BISHOP und G. O. BURR betonten diese Forscher den Einfluss vollständiger Ernährung auf den Ablauf der Geschlechtsfunktionen. Abgesehen davon, dass normales Wachstum und somit in erster Linie ausreichende Zufuhr von Vitamin A die Voraussetzung für normale Fortpflanzung sein muss, macht der Umstand, dass das Vitamin E, wie auch das oft mitfolgende Vitamin A² mit dem oxydativen Stoffwechsel verknüpft sind, ihre gegenseitige Abhängigkeit leicht verständlich.

Die Beteiligung des von FERNHOLTZ³ und von KARRER⁴ strukturell aufgeklärten Tocopherols an bestimmten Phasen der Fortpflanzung ist zwar im einzelnen noch nicht erkannt, aber das Zusammenwirken dieses Vitamins mit den Hormonen der Hypophyse sowie mit anderen am Wachstum beteiligten Hormonen dürfte als feststehend betrachtet werden können.

Bei der immer noch unvollständigen quantitativen Einsicht in das Wachstum sind ausser den unentbehrlichen, als Biokatalysatoren fungierenden Vitaminen noch weitere Stoffe in Betracht zu ziehen, welche — wie viele Aminosäuren, Purinderivate u. a. — zum Teil als Katalysatoren, zum Teil als Substrate reagieren. Man kann auf Grund naheliegender biochemischer Erwägungen erwarten, dass auch der normale Ablauf der Fortpflanzung sowie die Zahl und der Zustand der Nachkommenschaft in analoger Weise von Wirkstoffen verschiedener Art beeinflusst wird.

Von diesem Gesichtspunkt aus haben wir unsere Studie über diätische Beeinflussung der Fortpflanzungsfähigkeit mit der Untersuchung des Einflusses *natürlichen*, pflanzlichen und tierischen Materiales begonnen, und sind nur in einigen Fällen zu einzelnen *chemisch definierten*, *reinen* Substanzen übergegangen.

Methodik

Bei der Fortsetzung unserer eingangs erwähnten Arbeiten^{5,6} die zur Erweiterung unseres früher erhaltenen Versuchsmateriales angestellt wurde, machten wir während des Jahres 1947 die Erfahrung, dass unsere Versuchskost, welche wir bis dahin als vollwertig angesehen hatten, unter gewissen Umständen die normale Fortpflanzung der Versuchstiere nicht gewährleistet.

Die Versuchstiere hatten die in der citierten Untersuchung N:o I (Serie B, Seite 5) beschriebene Kost erhalten.

Wir geben nochmals die Kost der Versuchstiere (die Grundkost) an:

Trockenmilch	300 g	Frische Bäckerhefe	360 g
Margarine bzw. Butter	150 g	Salzmischung	48 g
Weizenstärke	360 g	1 %ige KJ-Lösung	12 ml

Ausserdem pro Woche: Calcipherol

Vitamin A 100 I. E.

¹ H. M. EVANS u. Mitarb. J. metab. Res. 1, 319 u. 335 (1922).

² Vgl. KARRER u. Mitarb. Helv. Chim. Acta 23, 455 u. 464 (1940).

³ E. FERNHOLTZ, J. Am. Chem. Soc. 59, 1154 (1937).

⁴ KARRER u. Mitarb. Nature, 141, 1057 (1937). — Helv. Chim. Acta 21, 520 u. 820 (1938).

⁵ B. v. EULER, H. v. EULER und I. RÖNNESTAM, Dieses Arkiv 22 A N:o 8 (1945/46).

⁶ B. v. EULER, H. v. EULER und I. RÖNNESTAM, Dieses Arkiv 24 A N:o 15 und N:o 20 (1946/47).

Sie waren von der Entwöhnung ab in 4 Gruppen verteilt:

Das Fett der Grundkost bestand in Gruppe I und II aus Butter, in Gruppe III und IV aus Margarine.

Gruppe I und III erhielten 0,5 mg dl- α Tocopherol per Woche.

Eine weitere Gruppe V erhielt die Normalkost für Zuchttiere, welche sich folgendermassen zusammensetzte:

6 Tage der Woche: Ausgangskost + gleiche Teile Milch und Wasser; einmal wöchentlich dazu Strömling oder Leber.

1 Tag der Woche Brot und Gemüse.

2 Mal in der Woche Fischlebertran: ca 20 g per kg trockener Ausgangskost.

Die Ausgangskost war folgendermassen zusammengesetzt:

64 % Mais	32 % Weizenkleie	3 % Kasein,	0.3 % NaCl
0.3 % CaCO ₃	Bäckerhefe, Wasser.		

Die Ratten waren im Juni und September gepaart worden. Beide Male waren in den 4 Versuchsgruppen nur wenige Weibchen trächtig geworden, und ausserdem war die Sterblichkeit unter den Jungen in diesen Gruppen sehr hoch, besonders während der ersten 2 Lebenswochen, in welchen die Jungen ausschliesslich von der Mutter ernährt werden. Die Tiere der Kontrollgruppe verhielten sich in dieser Hinsicht normal.

Dieser Befund zeigte, dass in unserer Versuchskost ein für die Fortpflanzung wichtiger Faktor, der sich in der Normalkost findet, *fehlt*. Um über diesen Faktor Aufklärung zu erhalten wurden die hier angegebenen Versuchsserien I–IV in folgender Weise angeordnet:

I. Versuchsserie: Versuchstiere aus obigen Gruppen I–IV wurden vom 12. Nov. 1947 an in 8 Gruppen eingeteilt, wie folgende Tabelle zeigt. Die Kontrollgruppe (früher Gruppe V) wurde beibehalten.

Gruppen:

I	Normalkost
II	Grundkost (mit Margarine) + Vit. A + Vit. E
III	» + Magermilch
IV	» + 10 g Salat per Woche
V	» + 100 γ Nikotinsäureamid per Woche
VI	» + 150 γ Laktoflavin per Woche
VII	» + 2 mg Askorbinsäure per Woche
VIII	» + 2 g Weizenkeimlinge per Woche
IX	Normalkost (Kontrollgruppe)

Jede Gruppe bestand aus 8 Weibchen und 2 Männchen.

5 Wochen nach Beginn der Verabreichung der oben genannten Diät, also am 18. Dezember 1947, wurden die Tiere nunmehr zum 3. Mal gepaart. Nach Abschluss der Graviditätsperiode konnte eine deutliche Verbesserung der Fortpflanzungsfähigkeit nur bezüglich der Gruppe I festgestellt werden, also bezüglich derjenigen Tiere, welche von der Grundkost auf die Normalkost übergegangen waren.

Auf Grund dieses Befundes wurden die in die Normalkost eingehenden animalischen Nahrungsmittel (Strömling, Leber) zum Gegenstand weiterer Versuche gemacht.

II. Versuchsserie: 5 Wochen vor der 4. Paarung, am 1. April 1948 erhielten die Versuchstiere deswegen die folgenden Diäten:

Gruppen:

	I	Normalkost (vom 12. November 1947)
	II	Grundkost + Vit. A + Vit. E
III	»	+1 g Leber/Tier und Tag
IV	»	+5 g » » » »
V	»	+1 g Strömling/Tier und Tag
VI	»	+5 g » » » »
VII	»	+1 g Rindfleisch/Tier und Tag
VIII	»	+5 g » » » »
	IX	Normalkost von Anfang an.

Die Ergebnisse der Paarungen im Dezember und im April, verglichen mit denjenigen vorhergehender Paarungen, sind in folgenden Tabellen 1, 2 u. 3 zusammengestellt.

Wie aus den Tabellen hervorgeht, hat sich das Gewicht der Jungen bei der Entwöhnung (im Alter von 2 Wochen) durch den Zusatz animalischer Nahrung stets verbessert. Der grössere Zusatz von Leber hatte eine vorteilhafte Einwirkung auch auf die Lebensfähigkeit der Jungen bzw. auf die Fähigkeit der Mütter, dieselben aufzuziehen. Auf Grund dieses Befundes wurde eine weitere, dritte, Versuchsserie angestellt und zwar mit Blut, mit Plasma und mit einem Trockenleberpräparat als Nahrungszusatz.

Die bisher verwendeten Versuchstiere hatten indessen ein Alter von 14 Monaten erreicht und hatten 4 Würfe hervorgebracht, und sie wurden deswegen durch neue Tiere ersetzt.

III. Versuchsserie. Diese Versuchsserie umfasste 6 Tiergruppen von je 8 Weibchen und 2 Männchen.

Die Kost der einzelnen Gruppen hatte folgende Zusammensetzung:

	I	Grundkost, wie bei den vorhergehenden Serien.
II	»	+6 ml Blut per Tier und Woche,
III	»	+1 g Plasma per Tier und Woche,
IV	»	+2 g Trockenleberpräparat per Tier und Woche,
V	»	+6 g feuchtes Malz (ab 5. Juli ersetzt durch 3,6 g trockenes Malz per Tier und Woche).
	VI	Normalkost.

Nachdem die Tiere 5 Wochen lang die Versuchskost erhalten hatten, wurden sie zum ersten Mal am 2 Juli gepaart. Von Anfang Juni an wurde das dl- α -Tocopherol durch die entsprechende Menge von Weizenkeimlinge ersetzt.

Bezüglich des Zusatzes zur Diät der Gruppe V. ist folgendes zu bemerken: Schon vor längerer Zeit haben EULER und MALMBERG an Weizen-Embryonen¹ sowie an Weizenkörnern² Wachstumswirkungen quantitativ festgestellt, und zwar sowohl an jungen Ratten, die unter Zusatz von Vitamin A bzw. A + E zur Grundkost ernährt

¹ EULER u. M. MALMBERG, Dieses Archiv 12 B N:o 14 (1936).

² EULER u. M. MALMBERG, Biochem. Z. 284, 238 (1936).

Tabelle 1
Anzahl geborener Junge

Gruppe	Weibchen Nr.	Paarung I. Juni		Paarung II. Sept.		Ab 12. Nov. Nahrungs- zusatz von	Paarung III. Dez.		Ab 24. Febr. Nahrungs- zusatz von	Paarung IV. April	
		leb.	tot	leb.	tot		leb.	tot		leb.	tot
I	1	1	8	—	—	Normalkost	5	—	Normalkost beibehalten	6	—
	2	3	—	10-2 ¹	—		4	—		5	—
	3	5	4	7	1		—	—		—	—
	4	2	9	6	2		—	—		—	—
	5	—	1	1	4		10-2	—		11-3	1
	6	2	6	7	1		10-2	—		8	—
	7	7	1	—	—		6	—		—	—
	8	—	—	—	—		9-1	—		8	—
		20	29	31-2	8		44-5	—		38-3	1
II	1	—	2	—	—	Kost nicht geändert	3	—	Kost nicht geändert	—	—
	2	2	—	5	1		7	—		10-2	—
	3	1	2	1	—		—	—		1	1
	4	2	2	3	1		5	—		3	—
	5	10	—	5	—		—	—		Weibchen tot	
	6	—	6	8	—		—	—			
	7	9	—	7	—		2	—			
	8	—	—	—	—		7	—			
		24	12	29	2		24	—		33-2	1
III	1	6	—	9-1	—	Magermilch ad libitum	—	—	1 g Leber pro Tag	8	1
	2	5	2	—	2		3	6		4	1
	3	6	—	1	2		—	—		3	1
	4	11	—	12-4	2		—	—		—	—
	5	9	—	13-5	—		4	—		1	—
	6	4	4	9-1	—		7	2		8	1
	7	3	—	—	—		11-3	—		8	2
	8	—	—	—	—		9-1	—		7	—
		44	6	44-11	6		34-4	8		39	6
IV	1	—	1	2	4	10 g Salat pro Woche	2	—	5 g Leber pro Tag	5	—
	2	—	—	3	—		1	—		5	—
	3	10	—	9-1	—		11-3	—		11-3	—
	4	—	—	10-2	1		1	—		Weibchen tot	
	5	6	1	5	—		8	1			
	6	2	4	10-2	1		6	—			
	7	—	—	11-3	—		9-1	—			
	8	—	—	—	—		9-1	1			
		18	6	50-8	6		47-5	2		21-3	—
V	1	6	5	—	—	100 γ NSA pro Woche	4	—	1 g Ström- linge pro Tag	6	—
	2	—	—	4	—		7	—		3	—
	3	—	—	1	—		8	—		5	—
	4	10	1	12-4	—		—	—		—	—
	5	5	—	7	—		8	—		4	—
	6	—	5	6	—		9-1	—		9-1	—
	7	—	7	10-2	—		1	—		Weibchen tot	
	8	—	—	—	—		10-2	—			
		21	18	40-6	—		47-3	—		27-1	—

¹ Die Würfe sind vom September ab auf 8 Jungen reduziert.

Tabelle 1 (Forts.)

Gruppe	Weibchen Nr.	Paarung I. Juni		Paarung II. Sept.		Ab 12. Nov. Nahrungs- zusatz von	Paarung III. Dez.		Ab 24. Febr. Nahrungs- zusatz von	Paarung IV. April	
		leb.	tot	leb.	tot		leb.	tot		leb.	tot
VI	1	—	3	—	—	150 γ Laktoflavin pro Woche	6	2	5 g Ström- linge pro Tag	Weibchen tot	
	2	—	3	5	3		6	—		9-1	—
	3	—	—	—	—		—	—		3	6
	4	5	4	1	—		—	1		7	1
	5	—	8	6	—		9-1	—		4	—
	6	7	—	6	—		7	—		Weibchen tot	
	7	6	—	7	—		7	—		11-3	—
	8	—	—	—	—		5	—		3	1
		18	18	25	3		40-1	3		37-4	8
VII	1	8	1	3	8	2 mg Ascor- binsäure pro Woche	—	—	1 g Rind- fleisch pro Tag	Weibchen tot	
	2	7	—	10-2	—		10-2	—		—	—
	3	—	2	6	—		1	4		—	—
	4	5	3	4	6		10-2	—		1	—
	5	—	—	4	—		8	—		3	1
	6	6	—	7	1		8	—		7	—
	7	—	—	—	—		1	6		1	—
	8	—	—	—	—		2	—		1	1
		26	6	34-2	15		40-4	10		13	2
VIII	1	—	—	11-3	—	2 g Weizen- keimlinge pro Woche	—	—	5 g Rind- fleisch pro Tag	9-1	—
	2	7	2	7	2		—	—		—	—
	3	1	3	—	—		—	—		Weibchen tot	
	4	—	6	5	—		—	—		5	1
	5	—	—	1	1		3	1		—	—
	6	—	—	6	—		10-2	—		11-3	—
	7	—	7	—	9		8	—		2	—
	8	—	—	—	—		3	—		3	—
		8	18	30-3	12		24-2	1		30-4	1
IX	1	Von der Entwöhnung ab Normalkost.					8	—	Normalkost	5	1
	2						10-2	—		8	—
	3	5/8 der Weibchen sind trächtig ge- worden bei der ersten Paarung.					3	1		—	3
	4						7	—		9-1	—
	5	Von 8 Weibchen hat man bei der 1. Paarung im Mittel 39 Junge erhalten.					—	—		—	—
	6						11-3	—		9-1	—
	7						11-3	—		8	1
	8						—	—		—	—
							50-8	1		39-2	5

wurden, als an Vit. A-frei ernährten Ratten. Für diese Wachstumswirkungen kamen die in den Weizenkörnern enthaltenen Vitamine der B-Gruppe nicht in Betracht. Der ev. Einfluss von Xanthophyll wurde besprochen.

Durch diese Versuchsserie wurde festgestellt, (Tabelle 4) dass unser Rattenstamm den Schwächezustand überwunden hatte, der sich darin zeigte, dass seine Fortpflanzungsgeschwindigkeit von vollwertiger Nahrung ausserordentlich beeinflussbar war. Alle Weibchen innerhalb der Gruppe, welche die unveränderte Grundkost erhalten

Tabelle 2

Anzahl und mittleres Gewicht der Jungen nach 2 Wochen

Gruppe	Weibchen Nr.	Paarung I. Juni		Paarung II. Sept.		Zusatz zur Kost ab Nov.	Paarung III. Dez.		Zusatz zur Kost ab Febr.	Paarung IV. April	
		Anzahl leb. J.	Gew. g	Anzahl leb. J.	Gew. g		Anzahl leb. J.	Gew. g		Anzahl leb. J.	Gew. g
I	1	0 aus 1	—	—	—	Normal- kost	3 aus 5	24,7	Normal- kost	5 aus 6	22,0
	2	0 » 3	—	0 aus 8	—		4 » 4	26,0		5 » 5	24,0
	3	0 » 5	—	0 » 7	—		—	—		—	—
	4	0 » 2	—	0 » 6	—		—	—		—	—
	5	—	—	0 » 1	—		8 aus 8	16,3		7 aus 8	17,1
	6	0 aus 2	—	4 » 7	14,5		7 » 8	21,4		7 » 8	18,9
	7	6 » 7	15,5	—	—		6 » 6	24,5		—	—
	8	—	—	—	—		8 » 8	18,5		6 aus 8	21,7
		6 aus 20	15,5	4 aus 29	14,5	36 aus 39 20,9				30 aus 35	20,7
II	1	—	—	—	—	Kost nicht ge- ändert	3 aus 3	16,3	Kost nicht ge- ändert	—	—
	2	0 aus 2	—	1 aus 5	9,0		0 » 7	—		3 aus 8	9,7
	3	0 » 1	—	0 » 1	—		—	—		0 » 1	—
	4	0 » 2	—	0 » 3	—		3 aus 5	22,3		0 » 3	—
	5	7 » 10	13,0	0 » 5	—		—	—		Weibchen tot	
	6	—	—	0 » 8	—		—	—		4 aus 6	18,8
	7	6 aus 9	11,8	6 » 7	12,5		2 aus 2	13,5		4 » 5	19,3
	8	—	—	—	—		3 » 7	11,0		6 » 8	16,3
		13 aus 24	12,4	7 aus 29	12,0	11 aus 24 16,0				17 aus 31	16,4
III	1	6 aus 6	16,0	1 aus 8	14,0	Mager- milch ad libitum	—	—	1 g Leber pro Tag	6 aus 8	13,5
	2	3 » 5	16,7	—	—		0 aus 3	—		4 » 4	19,5
	3	0 » 6	—	0 aus 1	—		—	—		0 » 3	—
	4	0 » 11	—	0 » 8	—		—	—		—	—
	5	8 » 9	14,6	7 » 8	16,4		4 aus 4	22,5		1 aus 1	13,0
	6	0 » 4	—	2 » 8	15,5		0 » 7	—		7 » 8	17,4
	7	1 » 3	21,0	—	—		6 » 8	14,0		6 » 8	16,7
	8	—	—	—	—		0 » 8	—		6 » 7	18,8
		18 aus 44	15,8	10 aus 33	16,0	10 aus 30 17,4				30 aus 39	16,9
IV	1	—	—	0 aus 2	—	10 g Salat pro Woche	2 aus 2	14,5	5 g Leber pro Tag	5 aus 5	21,6
	2	—	—	0 » 3	—		0 » 1	—		5 » 5	24,0
	3	0 aus 10	—	0 » 8	—		3 » 8	12,7		7 » 8	21,0
	4	—	—	0 » 8	—		0 » 1	—		Weibchen tot	
	5	0 aus 6	—	3 » 5	27,3		7 » 8	15,7		—	—
	6	0 » 2	—	0 » 8	—		4 » 6	16,3		—	—
	7	—	—	7 » 8	11,4		6 » 8	11,8		—	—
	8	—	—	—	—		0 » 8	—		—	—
		—	—	10 aus 42	16,2	22 aus 42 14,2				17 aus 18	22,1
V	1	0 aus 6	—	—	—	100 γ NSA pro Woche	0 aus 4	—	1 g Ström- linge pro Tag	4 aus 6	21,3
	2	—	—	0 aus 4	—		2 » 7	7,5		3 » 3	24,3
	3	—	—	0 » 1	—		6 » 8	10,3		4 » 5	18,8
	4	0 aus 10	—	0 » 8	—		—	—		—	—
	5	3 » 5	16,7	5 » 7	13,6		3 aus 8	14,3		0 aus 4	—
	6	—	—	0 » 6	—		0 » 8	—		8 » 8	12,3
	7	—	—	6 » 8	18,3		0 » 1	—		Weibchen tot	
	8	—	—	—	—		6 » 8	14,5		—	—
		3 aus 21	16,7	11 aus 34	16,2	17 aus 44 12,2				19 aus 26	17,5

Tabelle 2 (Forts.)

Gruppe	Weibchen Nr.	Paarung I. Juni		Paarung II. Sept.		Zusatz zur Kost ab Nov.	Paarung III. Dez.		Zusatz zur Kost ab Febr.	Paarung IV. April	
		Anzahl leb. J.	Gew. g	Anzahl leb. J.	Gew. g		Anzahl leb. J.	Gew. g		Anzahl leb. J.	Gew. g
VI	1	—	—	—	—	150 γ Lakto- flavin pro Woche	0 aus 6	—	5 g Ström- linge pro Tag	Weibchen tot	
	2	—	—	0 aus 5	—		0 » 6	—		4 aus 8	24,8
	3	—	—	—	—		—	—		0 » 3	—
	4	0 aus 5	—	0 aus 1	—		—	—		3 » 7	19,7
	5	—	—	0 » 6	—		3 aus 8	11,3		3 » 4	25,3
	6	7 aus 7	14,4	0 » 6	—		0 » 7	—		Weibchen tot	
	7	6 » 6	13,7	5 » 7	17,8		7 » 7	11,4		8 aus 8	16,0
	8	—	—	—	—		0 » 5	—		3 » 3	24,3
		13 aus 18	14,1	5 aus 25	17,8		10 aus 39	11,4		21 aus 38	20,7
VII	1	6 aus 8	13,5	0 aus 3	—	2 mg Ascorbin- säure pro Woche	—	—	1 g Rind- fleisch pro Tag	Weibchen tot	
	2	7 » 7	13,4	0 » 8	—		1 aus 8	7,0		—	—
	3	—	—	0 » 6	—		0 » 1	—		—	—
	4	0 aus 5	—	0 » 4	—		2 » 8	12,0		0 aus 1	—
	5	—	—	0 » 4	—		6 » 8	14,8		3 » 3	21,7
	6	3 aus 6	12,0	4 » 7	21,5		0 » 8	—		6 » 7	18,7
	7	—	—	—	—		0 » 1	—		0 » 1	—
	8	—	—	—	—		0 » 2	—		0 » 1	—
		16 aus 26	13,2	4 aus 32	21,5		9 aus 36	13,3		9 aus 13	19,7
VIII	1	—	—	0 aus 3	—	2 g Wei- zenkeim- linge pro Woche	—	—	5 g Rind- fleisch pro Tag	7 aus 8	13,1
	2	7 aus 7	14,0	0 » 8	—		—	—		—	—
	3	0 » 1	—	0 » 6	—		—	—		Weibchen tot	
	4	—	—	0 » 4	—		—	—		0 aus 5	—
	5	—	—	0 » 4	—		3 aus 3	12,0		—	—
	6	—	—	3 » 6	19,7		5 » 8	13,2		3 aus 8	23,0
	7	—	—	—	—		6 » 8	14,0		2 » 2	16,0
	8	—	—	—	—		3 » 3	14,0		3 » 3	22,0
		7 aus 8	14,0	3 aus 21	19,7		17 aus 22	13,4		15 aus 26	17,3
IX	1	Von der Entwöhnung ab <i>Normalkost</i> . Bei der 1. Paarung von 8 Weibchen im Mittel 39 Junge erhalten, wovon 34 entwöhnt wurden. Mittleres Gewicht 15,7 g				Normal- kost bei- behalten	8 aus 8	16,3	Normal- kost bei- behalten	4 aus 5	18,8
	2						8 » 8	18,9		7 » 8	20,7
	3						3 » 3	22,7		—	—
	4						6 » 7	21,7		8 aus 8	20,4
	5						—	—		—	—
	6						7 aus 8	24,3		8 aus 8	17,8
	7						8 » 8	21,3		8 » 8	17,8
	8						—	—		—	—
							40 aus 42	20,5		35 aus 37	19,1

hatten, wurden trächtig, die Anzahl Junge in den einzelnen Würfen war normal, und die Anzahl abgewöhnter Jungen war nur unbedeutend kleiner als die Zahl in derjenigen Gruppe, welche die Diät der Zuchttiere erhalten hatten.

Unter diesen Umständen war nicht zu erwarten, dass verschiedene Zusätze zur Kost besonders deutliche Ausschläge ergeben würden. Die einzige Zahl, welche noch die Überlegenheit der Normalkost über die Grundkost zeigt, ist diejenige, welche das mittlere Gewicht der *Jungen bei der Entwöhnung* angibt. Für die Gruppe, welche

Der Übersicht wegen fassen wir die in den Tabellen 1 und 2 mitgeteilten Resultate folgendermassen zusammen:

Tabelle 3

Gruppe Kost Versuchsserie I	Anzahl Würfe	% -zahl leb. Jungen nach		Mittleres Gewicht g nach			Neue Kost Versuchsserie II	Anzahl Würfe	% -zahl leb. Jungen nach		Mittleres Gewicht g nach		
		2 W.	4 W.	2 W.	4 W.				2 W.	4 W.	2 W.	4 W.	
					♂	♀						♂	♀
I. Normalkost	6	92	92	20,9	44,1	38,8	Normalkost . . .	5	86	86	20,7	48,6	45,1
II. Grundkost	5	46	42	16,0	47,3	42,5	Grundkost . . .	6	58	52	16,4	42,6	40,4
III. + Magermilch . .	5	33	30	17,4	55,1	53,5	Leber 1 g	7	76	74	16,9	41,9	40,2
IV. + Salat	8	51	51	14,2	34,8	33,6	» 5 g	3	94	94	22,1	48,6	48,5
V. + NSA	7	39	30	12,2	33,3	37,2	Strömlinge 1 g .	5	73	73	17,6	48,5	38,4
VI. + Laktoflavin . .	6	26	15	11,4	27,3	41,3	» 5 g	6	64	64	20,6	53,1	45,9
VII. + Ascorbinsäure .	5	25	22	13,3	37,3	37,0	Rindfleisch 1 g .	5	69	69	19,7	41,6	43,0
VIII. + Weiz. Keiml. .	4	77	73	13,4	38,1	35,7	» 5 g	5	58	46	17,3	58,3	50,8
IX. Normalkost von Anfang an	6	95	95	20,5	50,6	45,3	Normalkost . . .	5	95	95	19,1	41,8	40,9

das Leberpräparat erhalten hat, liegt diese Zahl zwischen den entsprechenden Werten für Gruppe VI (Normalkost) und den Werten, welche die übrigen Gruppen betreffen.

Deswegen haben wir diese Versuchsserie mit einem Präparat fortgesetzt, das uns auf Grund der in letzter Zeit mit Folinsäure-Präparaten erhaltenen Ergebnisse von Interesse schien:

IV. Versuchsserie. Während 5 Wochen vor Beginn der 2. Paarung dieser Tiere im November 1948 erhielten die Tiere der Gruppe V der vorhergehenden Versuchsserie ein Präparat folgender Zusammensetzung in der Menge 140 mg per Tier und Tag.

10 mg Folvite (LEDERLE) 10 mg Pantothensäure
20 mg Nikotinsäureamid 860 mg alkalibehandelte Glukose, enthaltend
ca 8 % Redukton und 25 % NaCl.

Der Einfluss des Reduktons¹ wurde geprüft, da nach einem Verfahren der *American Cyanamide Comp.*² Redukton Ausgangsmaterial für die Synthese von Pteroyl-Glutaminaten ist. Es war die Möglichkeit gegeben, dass das aus Glukose entstehende Redukton auch in vivo Anlass zu ähnlichen Synthesen geben kann.

Wie die Tabelle 4 zeigt, wurde durch diesen Zusatz das mittlere Gewicht der Jungen *nicht* erhöht. Auch war die prozentische Anzahl abgewöhnter Junger niedriger als diejenige in der Gruppe, welche Grundkost ohne Zusatz erhielt.

Wir haben erwogen, ob der hohe Salzgehalt des Präparates etwa einen ungünstigen Einfluss auf den Allgemeinzustand der Tiere gehabt hat, und bei einem *erneuten* Versuch mit den gleichen Versuchstieren gingen wir deshalb zu Präparaten über, welche ein Pteroyl-Hepta-Glutaminat der Firma *Merck, Rahway*, enthielt. Es wurde

¹ Redukton: EULER u. MARTIUS, Lieb. Ann. 505, 73 (1933).

² Contributions from the American Cyanamid Comp. J. Am. Chem. Soc. 70, 25 u. 27 (1948).

Tabelle 4

Dritte und vierte Versuchsserie. Erste und zweite Paarung

Gruppe Kost Paarung am 2. Juli 1948 3. Versuchsserie	Anzahl Würfe	Anzahl geb. Jungen	% -zahl leb. Jungen nach		Mittleres Gewicht g nach			Neue Kost- zusätze Paarung am 5. Nov. 1948 4. Versuchsserie	Anzahl Würfe	% -zahl leb. Jungen nach		Mittleres Gewicht g nach		
			2 W.	4 W.	2 W.	4 W.				2 W.	4 W.	2 W.	4 W.	
						♂	♀						♂	♀
I. Grundkost	8	70—15	82	82	14,2	36,5	37,8	I. Grundkost	8	77	74	17,5	41,6	44
II. + Blut ...	7	56— 3	79	79	14,1	36,0	30,9	—						
III. + Plasma.	8	65—10	70	60	14,8	37,8	37,0	—						
IV. + Leber- präparat ..	6	46— 5	76	76	17,9	38,5	36,8	—						
V. + Malz ...	6	67— 8	61	61	13,9	45,7	43,8	V. + Folin- säurepräp. NaCl-haltig	8	68	66	15,6	36,7	36
VI. Normal- kost	8	78—19	93	93	21,5	47,7	43,3	VI. Normalkost	6	100	100	24,6	46,4	47

Tabelle 5

Dritte Paarung am 2. März 1949. Folin-säure

Gruppe Kost	Anzahl Würfe	Anzahl geb. Jungen	% -zahl leb. Jungen nach		Mittleres Gewicht g nach		
			2 W.	4 W.	2 W.	4 W.	
						♂	♀
I. Grundkost	6	37	68	68	15,3	38,1	38,2
V. + Folin-säure 10 mg/Woche	4	31—2	21	21	16,3	53,5	49,5
VI. Normalkost	5	33—2	100	100	21,3	46,8	45,9

in den Vorbereitungs-Wochen in folgender Mischung verabreicht; und zwar in Dosen von 10 mg per Tier und Woche:

In 5 mg waren enthalten:

- 4,2 mg Nikotinsäureamid
- 0,7 mg Urethan
- 0,2 mg Pteroyl-Hepta-Glutaminat.

In den letzten 4 Versuchswochen wurden per Tier und Tag gegeben:

- 0,5 mg Pteroyl-Hepta-Glutaminat
- +300 γ Kobalt-Chlorid.

Nach erneuter Paarung (Tab. 5) wurden in dieser Versuchsgruppe nur 4 Weibchen von 8 trächtig, nur 6 Junge von 29 lebten bis zur Entwöhnung, und das mittlere Gewicht der Jungen war niedriger als in der Gruppe, welche die Normalkost der Zuchttiere erhalten hatten.

Der Sexualeyklus wurde während 10 Tagen an 8 Weibchen verfolgt, welche bei der letzten Paarung im Alter von etwa 400 Tagen nicht trächtig geworden waren. Eines der untersuchten Weibchen (Gruppe III) zeigte andauernd Diöstrus. Bei einem Weibchen der Gruppe IV war der Östrus regelmässig, die übrigen zeigten Unregelmässigkeiten hinsichtlich des Auftretens der verschiedenen Stadien des Cyklus.

Die verwendeten Folinsäure-Präparate entsprechen also mit Sicherheit *nicht* demjenigen Leberbestandteil, der in der vorhergehenden Serie sich als wirksam erwiesen hatte. Vitamin B₁₂ stand uns bei diesen Arbeiten noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

Die verhältnismässig geringe Zahl trächtiger Weibchen kann indessen mit dem Alter der Tiere zusammenhängen. Dasselbe betrug etwa 400 Tage bei der Paarung.

Wie aus den Tabellen I und II hervorgeht, welche die für die einzelnen Tiere der ersten Versuchsserien gewonnenen Primärzahlen enthalten, sind während der 2. Hälfte der Versuchszeit innerhalb der meisten Gruppen 1 oder 2 der Tiere gestorben. In der 3. Versuchsserie (1948) starb nur 1 Weibchen während der Versuchszeit, und zwar in der Gruppe VI. Alle diese Tiere sowie eine grössere Anzahl von denjenigen, welche nach Ablauf der Versuchszeit starben oder getötet worden waren, wurden seziiert.

Sektionsbefunde

Serie I und II

Gruppe I. Normalkost

27.5.48. Nr. 48579 Keine Jungen. Lungen mit Pleura verwachsen. In der Niere Granula.

Gruppe II. Grundkost.

21.4.48. 48533 Normal.

25.5.48. 48496 Normal.

4.5.48. 48473 Reichliches Fettgewebe. Rechte Seite des Uterus weit mehr entwickelt als die Linke. Keine anderen Veränderungen bemerkbar.

Gruppe III. Magermilch; 1 g Leber

12.5.48. 48498 Normal.

Gruppe IV. Salat; 5 g Leber

21.4.48. 48584 Normal.

15.5.48. 48465 Grosser Abszess im Unterleib. Lebergewicht 12 g. Der Abszess etwa 15 ccm gross mit Eiter gefüllt.

25.3.48. 48510 Die Organe normal. Starke Gasbildung im Darm.

25.5.48. 48583 Keine Jungen. Zwei Nierensteine in der rechten Niere.

Gruppe V. Nikotinsäureamid; 1 g Strömlinge

21.4.48. 48598 Keine Jungen. Die Organe normal.

25.5.48. 48516 Keine Jungen. Dicker harter Uterusmund. Cystis in den Nieren.

12.5.48. 48602 Normal.

19.4.48. 48599 Keine Jungen. Sehr grosses (26 g) Mammacarcinom. Stasis in der Leber, Eingeweide sehr fett.

Gruppe VI. Laktoflavin; 5 g Strömlinge

- 21.4.48. 48502 Normal.
25.5.48. 48514 Normal.
29.4.48. 48511 Normal.
27.3.48. 48603 Grosser (ca 20 g) Abszess im unteren Brustkasten. Die eine Lungenhälfte stark verändert, Oberfläche der Nieren rauh.

Gruppe VII. Ascorbinsäure; 1 g Rindfleisch

- 21.4.48. 48555 Normal.
29.4.48. 48501 Normal.
27.5.48. 48554 Keine deutlichen Anomalien.

Gruppe VIII. Weizenkeimlinge; 5 g Rindfleisch.

- 6.3.48. 48513 Blutstauung in der Leber. Mikroskopische Untersuchung: Das Leberparenchym ist gespalten durch eine starke intraparenchymale Hämorrhagie.
13.4.48. 48493 Herz nicht normal entwickelt. Abszess in der Lunge mit schleimigem Eiter.
48543 Keine Jungen. Sand in rechter Pelvis.

Gruppe IX. Normalkost von der Entwöhnung an.

- 25.5.48. 48632 Normal.
11.5. 48635 Normal.

Serie III und IV

Gruppe I. Normalkost.

- 9.5.49. 49407 Bronchitis im mittleren Teil der linken Lunge. Leichte Anämie.
9.5.49. 50106 Viele mittelgrosse und kleinere Lungenabszesse.
9.5.49. 50398 Keine pathologischen Befunde.

Gruppe V. Leberpräparat; Folsäurepräparat.

- 9.5.49. 49411 Keine pathologischen Befunde.
9.5.49. 49396 Abszess im mittleren rechten Lungenflügel.
9.5.49. 49437 Pneumonie in beiden Lungen.

Gruppe VI. Normalkost.

- 9.5.49. 49412 Grosser eingekapselter Abszess im unteren rechten Lungenflügel. Gewicht der Leber 16,2 g.
28.3.49. 49406 Keine pathologischen Befunde.
9.5.49. 49407 Mehrere ziemlich grosse Pneumonie-Herde in beiden Lungen, teilweise mit Abszessbildung. Der mittlere rechte Lungenflügel mit dem Brustkorb verwachsen. Lebergewicht: 10,7 g.
9.5.49. 49431 Konfluierende Bronchopneumonie im mittleren rechten und unteren linken Lungenflügel. Übrige Organe normal. Lebergew. 6,4 g.

Zu der mit „Folsäure“ (folic acid), Pteroyl-Glutaminaten, angestellten Versuchsserie IV ist noch folgendes zu bemerken:

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchung wurden die in der Leber und in ande-

rem Material vorkommenden, zunächst als Heilfaktoren der perniziösen Anämie interessierenden Stoffe in verschiedenen Laboratorien eingehend bearbeitet.

Der ursprünglich als Folinsäure (folic acid) bezeichnete, aus Spenat gewonnene Faktor (MITCHELL, SNELL u. WILLIAMS, J. Am. Chem. Soc. 63, 2384 1941) stimuliert das Wachstum von Staphylococcus-Kulturen. Der Name Folinsäure wurde dann (wenig konsequent) auf Lactobacillus casei-Faktoren übertragen. Gegenwärtig sind 3 solche Faktoren bekannt; sie stammen aus Leber, aus Hefe und aus Bakterien.

Der besonders von *Lederle Comp.* bearbeitete und synthetisch hergestellte Leber-Faktor erwies sich, ebenso wie die beiden anderen L. casei Faktoren als Pteroyl-Glutaminat. Dieser Leber-Faktor erhielt gelegentlich auch die Bezeichnung Vitamin Bc.

Ein wichtiger Fortschritt wurde im Jahr 1948 etwa gleichzeitig in den Laboratorien von MERCK, RAHWAY und in den GLAXO-Laboratorien in England erzielt: Es gelang ein anti-anämisch wirksames Präparat, nunmehr Vitamin B₁₂ genannt, mit einem erheblichen Gehalt von Kobalt zu isolieren. Obwohl schon früher Wirkungen dieses Oligo-Metall- bekannt waren, wurden nun die biochemischen Effekte des Kobalts, besonders die blutbildenden Wirkungen, Gegenstand eingehender Studien.

Kobalt bildet mit verschiedenen Stoffen Chelate, in welchen die sauerstoffübertragende Fähigkeit des Kobalts ausserordentlich erhöht ist¹. Der hemmende Einfluss von Kobaltsalzen dürfte mit seiner Fähigkeit, Nukleoproteide zu fällen, zusammenhängen. Vgl. EULER, Kem. Arbeten. Ny följd B. Band 12 (1949).

Ergebnisse

Die hier mitgeteilten Versuche zeigen, dass in der mit den bekannten Vitamin-Zusätzen versehenen Grundkost unserer Ratten wenigstens noch *ein* Nahrungsfaktor zur Erreichung der optimalen Entwicklung und Fertilität fehlt, der in der gemischten Kost der Normaltiere vorhanden ist.

Wir betonen den Umstand, dass es sich hier um einen in der gemischten Normal-kost unserer Ratten vorkommenden Faktor handelt, weil durch diese Begrenzung ein grosser Teil hormonaler Wachstumsstoffe, wie z. B. Thyroxin und besonders alle den Versuchstieren nicht körpereigenen oder ihrer natürlichen Nahrung fremden Substanzen von der Besprechung ausgeschlossen werden.

Wenn auch unsere Versuche nicht mit einer grossen Zahl von Nahrungszusätzen angestellt worden sind, so dürfte doch deutlich daraus hervorgehen, dass ein in der *Leber* vorhandener Faktor für Entwicklung und Fortpflanzung der Ratten von besonderer Bedeutung ist.

Die *absolute* Gewichtszunahme und Fertilität, die bei gewissen Diäten eintritt, ist eine spezifische Eigenschaft jedes Rattenstammes, die auch von seiner Vorgesichte, von klimatischen Einflüssen, von der lokalen Beschaffenheit des Trinkwassers u. s. w. abhängt. Der Einfluss von Nahrungszusätzen zu einer genau festgelegten Diät hat sich hingegen am Tiermaterial verschiedener Laboratorien zwar nicht ganz, aber immerhin in grosser Annäherung als gleichartig erwiesen. Demgemäss ist der in unseren Versuchen festgestellte Mangel keineswegs eine für unseren Stamm spezifische Erscheinung.

¹ M. CALVIN u. Mitarb. J. Am. Chem. Soc. 68, 2278 (1946). — Vgl. EULER, Dieses Arkiv, 1 (1949).

² EULER, Dieses Arkiv 1, N:o 31 (1949). — N. BARGONI, Dieses Arkiv 1, N:o 28 (1949).

In der Tat hat sich ein analoger Mangel in einer Reihe von ernährungsphysiologischen Untersuchungen gezeigt. Wir erwähnen hier aus den letzten Jahren zunächst eine Arbeit von ZUCKER und ZUCKER¹ in der zusammenfassend betont wird:

“For successful propagation the rat requires another factor besides the known essentials which are required for fertilisation, gestation and lactation.”

Die mit u. a. Leberextrakten gewonnenen Ergebnisse dieser Forscher (vgl. l. c. p. 120) sowie eine Publikation von CARY, HARTMAN, DRYDEN und LIKELY² soll demnächst in einem anderen Zusammenhang näher besprochen werden. Ueber die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften des mangelnden Nahrungsfaktors (Zoopherin) haben die genannten Autoren noch keine Angaben gemacht. Er findet sich nach HARTMAN u. a. nicht in Weizenmehl, Maisgrütze, Weizenkleie, geronnenem Eiweiss, Hefe, Sojabohnen und Leinensamenmehl und entfettetem entkeimten Baumwollsaamenmehl. Er *findet sich* dagegen in Leberextrakten, Rinder- und Schweinemuskeln, Eidotter und sowohl in blättrigen Pflanzen und Futter als auch in Milch und Milchprodukten.

In dem kürzlich in Stockholm gehaltenen Vortrag sagen die Autoren: „Seit der Verfassung dieses Berichtes zeigte es sich, dass der obenangeführte, unidentifizierte Wachstumsfaktor in Milch und fettfreien Milchprodukten ein chemisch unidentifiziertes, undialysierbares Material ist, das entweder B₁₂ liefert, oder ein weiteres Material liefert, das im normalen Säugetier in noch unbekannter Weise wie B₁₂ funktioniert.“

Da über die Wirkungsweise des Vitamines B₁₂, dessen Heilwirkung bei perniziöser Anämie³ von grösstem Interesse ist, noch nichts näheres bekannt geworden ist, kann die Vermutung von HARTMAN u. a. einstweilen nicht diskutiert werden.

Von wesentlichem Interesse ist zunächst die Entscheidung, ob es sich bei dem fehlenden auch in entfetteter Milch vorkommenden Leber-Faktor 1) um ein Pteroyl-Glutaminat⁴, 2) um einen Kobalt-Komplex handelt.

Es dürfte kaum einem Zweifel unterliegen, dass der von HARTMAN et. al.⁵ in Leber und in „fettfreien Milchprodukten“ vermutete Nahrungsfaktor zu dem 1944 von EULER, EULER, RÖNNESTAM-SÄBERG und HÖGBERG⁶ aufgefundenen und untersuchten „Wachstumsfaktoren der Magermilch“ in nächster Beziehung steht, wie ein experimenteller Vergleich ergeben wird.

Die aus äusseren Gründen abgebrochene Untersuchung über Faktoren der Fortpflanzung, welche besonders in Rücksicht auf die Wirkungen des Kobalts und gewisser Kobaltkomplexe von wesentlichem theoretischen und praktischem Interesse ist, wird in anderem Zusammenhang wieder aufgenommen.

Stockholm, Universität, Vitamin-Institut.

¹ L. M. ZUCKER and TH. F. ZUCKER, Archives of Bioch. 16, 115 (1947).

² C. A. CARY, A. M. HARTMAN, L. P. DRYDEN and G. D. LIKELY, Federation Proc. 5, 128 (1946).

³ Vgl. die Monographie von A. ASCHKENASY, Exp. Ann. de Biochimie Méd. X. Sér. 309 (1949). — EULER, Dieses Arkiv 1, 31 (1949).

⁴ E. L. RICKES et al. Science 108 634 (1948). — E. LESTER SMITH, Nature, 161, 638 (1948). — 164 144 (1948). — D. G. CAMERON et al. Nature, 164, 188 (1949).

⁵ Siehe auch XII. Intern. Milchwirtschaftskongress, Vol. 2. Section II. s. 156 (1949).

⁶ EULER, H. v., B. v. EULER, I. RÖNNESTAM-SÄBERG u. B. HÖGBERG, Dieses Arkiv 19 A N:o 3.—19 B Nr. 3.—20 A Nr. 9 (1945).

Tryckt den 3 mars 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Ester der Reduktone

Zur Kenntnis zweibasischer Säuren

Von HANS VON EULER, HANS HASSELQUIST und UNO LÖÖV

Mit 1 Figur

Äther der Reduktone sind bereits in grösserer Anzahl bekannt.

Schon 1933 hat MARTIUS¹ einen Monomethyläther des Triose-Reduktions mittels Diazomethan dargestellt², und neuerdings konnten HASSELQUIST und LÖÖV zwei Methylgruppen in das Triose-reduktion einführen. Von der Ascorbinsäure sind durch HAWORTH und MITARB. die folgenden Methyläther bekannt geworden:

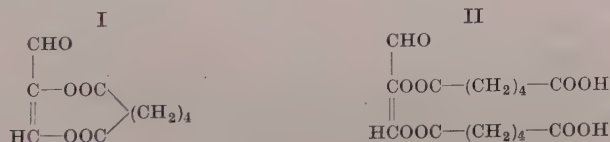
2-Methyl, 3-Methyl, 2,3-Dimethyl, 2,3,5-Trimethyl und 2,3,5,6-Tetramethylascorbinsäure.

Dagegen sind bis jetzt nur wenige *Ester* der Reduktone beschrieben. Was zunächst Ester *einbasischer* Säuren betrifft, so haben EULER und HASSELQUIST³ kürzlich eine Substanz vom Schmp 188–189° isoliert, deren Zusammensetzung und Eigenschaften auf den Di[p-nitrobenzoyl]-ester des Reduktions, C₁₇H₁₀O₉N₂ stimmen. Die Subst. ist schwer löslich in Wasser, Alkohol und Petroleumäther, löslich in Chloroform und Aceton, leicht löslich in Benzol; sie ist unlöslich in verd. Alkali und in Salzsäure.

Die Veresterung der Endiolhydroxyle mittels Säurechloriden scheint leicht zu erfolgen.^{4, 5}

Veresterung von Triose-Reduktion mit Adipinsäure

Mit *zweibasischen* Säuren sind verschiedene Typen von Derivaten möglich, die von mehreren Gesichtspunkten aus Interesse verdienen. Betrachten wir als Beispiel die Adipinsäure, so können — ausser dem Reduktion-mono-adipinsäureester — noch folgende Produkte in Betracht kommen.



¹ EULER und MARTIUS, Lieb. Ann. 505, 73, (1933).

² Siehe auch Monographie, Reduktone. Stuttgart, Enke, Im Druck.

³ EULER u. HASSELQUIST, dieses Archiv 26 A Nr. 25 (1949).

⁴ N. W. HAWORTH u. Mitarb. J. Chem. Soc. London 1934, 1556.

⁵ N. W. HAWORTH u. Mitarb. J. Chem. Soc. London 1937, 829.

Ferner können die beiden freien Karboxylgruppen von II mit je einem weiteren Molekül Redukton verestert werden und Anlass zu Esterketten geben, welche sich sowohl durch die Aldehyd-Gruppe als durch die Doppelbindung vernetzen lassen.

Es wurde deshalb zunächst der folgende Versuch angestellt:

0.6 g Redukton wurden in 2 ml Pyridin + 2 ml Benzol gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von Adipinsäurechlorid (erhalten aus 1 g Adipinsäure + 2.5 g PCl_5) in 30 ml Benzol in der Kälte versetzt. Es fiel sofort ein Öl aus, das nach 1-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur von der überstehenden Benzollösung getrennt und mit Benzol gewaschen wurde. Nach Trocknen im Vakuum wurde dasselbe mit Wasser verrührt, worin es sich nicht löst. Nach Entfernen des Wassers hinterblieb ein schwach gelbliches Öl, das bis jetzt nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte.

Ein Versuch, das Öl als Semicarbazon in analysenreinen Krystallen zu erhalten lieferte nach 48-stündiger Einwirkung von Semicarbazid-hydrochlorid + NaAc Krystalle, welche bei 243° unter Zersetzung schmolzen und sich als Redukton-semicarbazon erwiesen.

Kondensations- und ev. Polymerisations-Produkte ähnlicher Art wie mit Redukton liessen sich erwarten nach Einwirkung von zweibasischen Säuren, z. B. Adipinsäure auf *Dioxyaceton*. Der Versuch ergab folgendes:

Zu 4 g Adipinsäure in 10 ml Benzol wurden 10 g PCl_5 zugegeben. Nach 5-stündiger Einwirkung bei Zimmertemperatur wurden Benzol und POCl_3 in Vacuum abdestilliert, wobei Adipinsäurechlorid als schwach gelbbraunes Öl zurückblieb. Dasselbe wurde mit 60 ml Benzol und mit einer Lösung von 2,4 g Dioxyaceton in 5 ml Pyridin versetzt. Unter Wärmeentwicklung bis $50-60^\circ$ fiel ein hellgelbbraunes Öl aus. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert, und das entsprechende Volumen Alkohol zugegeben. Bei Zusatz von Wasser zu dieser alkoholischen Lösung fiel ein weisses, zunächst öliges, dann in der Kälte vollständig krystallisierendes Produkt aus, das abfiltriert und mit Wasser und Alkohol gewaschen, den Schmp $84-90^\circ$ zeigte. Ausbeute 2,4 g. Nach 3 Umkrystallisationen aus Alkohol stieg der Schmp auf $98-100^\circ$. Bei weiterem Umkrystallisieren verblieb der Schmp der unregelmässig aussehenden Krystalle unverändert bei $98-100^\circ$. Das reine Produkt (Sbst. 88) ist löslich in warmem Alkohol, und in warmem Wasser, unlöslich in Äther und Benzol.

Im Gegensatz zu Dioxyaceton entfärbt Sbst. 88 Dichlorphenolindophenol (TILLMANS' Reagens, TR) nach Einwirkung von 1 n NaOH in der Kälte *nicht*, woraus zu schliessen ist, dass der primär entstehende Adipinsäureester durch Alkali bei 0° nicht gespalten wurde.

Titration der Sbst. 88 mit Natronlauge. 14.9 mg Sbst. wurden mit 0.0407 Natronlauge bei Zimmertemperatur titriert wobei 5,0 ml Natronlauge verbraucht wurden.

$$14.9 = 0.0407 \cdot 5,0 \cdot E$$

$$E \text{ gef.} = 73,5$$

Da die Sbst. 88 sehr langsam verseift wird liess man die Lösung mit Überschuss von NaOH zwei Tage stehen und titrierte dann mit 0,1 n HCl zurück. Es wurden im ganzen 5,0 ml 0,0407 -n NaOH, entsprechend 3 Mol. NaOH verbraucht, und zwar 1 Mol. für das entstandene Dioxyaceton.

Titration mit TR: 6,5 mg Sbst. 88 in 5 ml Wasser suspendiert wurde nach Zusatz von 0,2 ml 1 n NaOH mit 0,01 n TR bei 20° unter Stickstoff titriert. Verbrauch 6,5 ml TR-lösung

$$6,5 = 6,5 \cdot 0,01 \cdot E$$

$$E \text{ gef.} = 100$$

Mikro-Elementar-Analysen: Für die Berechnung der Zusammensetzung kommen in Betracht:

Offener Mono-Ester	C 49,54	H 6,47
Unendl. lange Esterkette bzw. ringförmige Verbindung (Austritt von 2 H ₂ O per Mono-Ester.....)	54,00	6,04
(Adipinsäure-Dioxyaceton) ₂ C ₁₈ H ₂₆ O ₁₁ (n = 2).....	51,67	6,27
Gefunden.....	51,62	6,44

Zufolge Titrierung mit TR bei 20°

Für n = 3 Ber. E = 103
n = 2 » 105
Gefunden = 100

Zufolge Titrierung mit NaOH bei 20°

Für n = 3 Ber. E = 69
n = 2 » 70
Gefunden = 73,5

Die gefundenen Werte stimmen also am besten mit der Formel C₁₈H₂₆O₁₁, also mit (Adipinsäure-Dioxyaceton)₂.

In vielen Fällen scheint die Fähigkeit unserer Kondensationsprodukte substantive Farbstoffe (Kongo) zu adsorbieren, mit ihrer Ringstruktur in Beziehung zu stehen. Bei Sbst. 88 fiel diese Adsorptionsprobe negativ aus, was mit den sonstigen Ergebnissen übereinstimmt.

Veresterung des Triose-Reduktions mit Bernsteinsäure

440 mg Redukton in 1,6 ml Pyridin gelöst, wurden tropfenweise unter Umrühren mit einer Lösung von 1,5 g Bernsteinsäure-dichlorid in 10 ml Benzol versetzt. Die sofort ausfallende pulverförmige Sbst. wurde abfiltriert, mit Benzol gewaschen und vom Lösungsmittel befreit. Sie wurde dann in 100 ml abs. Alkohol suspendiert; innerhalb 2 Stunden geht dabei Pyridinhydrochlorid in Lösung. Nach wiederholtem Aufschlännen war die Subst. halogenfrei; das farblose Pulver schmolz über 300°. Leichtlöslich in Wasser, aber schwerlöslich in allen üblichen organischen Lösungsmitteln.

Beim starken Erhitzen bildet sich unter Zersetzung ein sprödes Harz.

Die wässrige Lösung wurde mit PbAc₂ und Alkali versetzt und 3 Min. auf 90° erwärmt und dann mit Essigsäure neutralisiert. Eine geringe Bleisalz-fällung wurde abfiltriert, mit Wasser, Aceton und Äther gewaschen. Bei der Lösung von etwas Bleisalz in Essigsäure und Zusatz von Tillmans' Reagenz trat keine Entfärbung ein. Bei der Erwärmung mit Alkali wird somit kein Redukton zurückgebildet.

Lässt man eine wässrige Lösung frei abdunsten so entsteht ein durchsichtiger Harzfilm, was darauf hindeutet, dass sich die Sbst. polymerisiert hat.

2,4 mg Sbst. in 10 ml Wasser wurde unter Stickstoff mit 1 ml 2 n NaOH versetzt und mit 0,01 n Tillmans' Lösung bei 60° titriert, wobei 0,9 ml der TR-Lösung verbraucht wurde. Hieraus berechnet sich E = 267. Da nun E von 1 Mol Redukton bzw. Endiol herrührt ergibt sich für M_{min} der Wert 534. Dieses hohe Molekulargewicht kann so gedeutet werden, dass die polymere Sbst. Redukton in einer solchen Bindung enthält, dass nur ein Teil davon auf Zusatz von Alkali freigemacht wird.

Aus dem Ergebnis einer Titration mit NaOH kann geschlossen werden, dass bei der Alkali-Einwirkung Bruchstücke des Moleküls entstehen, die Redukton und Bernsteinsäure im Verhältnis 1:1 enthalten.

Veresterung der Glukose mit Adipinsäure

Während die Acetylierung der einfachen Zuckerarten seit EMIL FISCHER eine wohlbekannte Reaktion ist, sind zweibasische Säuren mit Zuckerarten seltener verestert worden. Mit Adipinsäure wurde folgender Versuch ausgeführt: 3,6 g fein gepulverte Glukose, in 5 ml Pyridin suspendiert, wurde mit einer Lösung von Adipinsäuredichlorid (erhalten aus 3 g Adipinsäure plus 7,5 g PCl_5) in 50 ml Benzol bei 0° versetzt. Es fiel ein farbloses Öl aus, vermisch mit Krystallen. Nach 1 Stunde wurde die Benzollösung abdekantiert, der Rückstand mit Benzol gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Benzols wurde das Öl mit einem gleichen Volumen Wasser versetzt, wobei die Krystalle (unänderte Glukose plus Pyridinchlorhydrat) in Lösung gingen. Das Öl verwandelte sich allmählich in ein ziemlich festes weisses elastisches Pulver, das mit Wasser gewaschen in allen üblichen Lösungsmitteln unlöslich war. Kochen des elastischen Pulvers mit Äthylendiaminhydrat rief keine merkbare Veränderung hervor.

Wurde der gleiche Versuch bei Zimmertemperatur ausgeführt, so trat starke Wärmeentwicklung ein. Das Reaktionsprodukt hatte dann eine gelartige Konsistenz; durch Pressung wurde die Masse in kleinere Einheiten zerbröckelt. Bei längerem Stehen verwandelte sich die Masse allmählich in einen klebrigen Teig, unlöslich in allen organischen Lösungsmitteln; Wird durch Kochen mit 2 n Natronlauge allmählich zersetzt.

Tillmans Reagens wird durch die obigen Ester-Präparate in alkalischer Lösung weder in der Kälte noch in der Wärme reduziert.

Kondensation des Glycerins mit Adipinsäure und ihren Homologen

Hier sind die polymeren Stoffe in mancher Hinsicht von Interesse. Einfache Glycerinester der Adipinsäure und ihrer Homologen haben wir nur zum Vergleich mit den oben beschriebenen Estern des Reduktons sowie der Aldo- und Keto-Alkohole dargestellt, und haben ihnen im übrigen umso weniger Aufmerksamkeit gewidmet, als solche Glycerinester bereits seit langer Zeit bekannt sind.

M. BERTHELOT¹ hat 1854 durch Erhitzen von Sebacinsäure mit Glycerin auf 200° eine kleine Menge eines neutralen, krystallisierten Produktes erhalten, dessen Analyse in einiger Annäherung mit der Zusammensetzung eines Sebacylsäure-Glycerin-Esters stimmte. Ein (vermutlich ähnliches) Reaktionsprodukt „Sebine“ erhielt BERTHELOT aus den beiden Komponenten durch Einwirkung von gasförmiger Salzsäure bei 100° ; es war flüssig und gemischt mit Chlorhydrin. Bei 120° scharf getrocknet lieferte es nach einigen Tagen teilweise Krystalle; auf minus 40° abgekühlt erstarrte es vollständig.

Etwa 80 Jahre später stellte BRUSON² durch Erhitzen von 1 Mol. Glycerin mit 1,5 Mol. Sebacylsäure auf 170° einen Weichmacher her und liess sich ein Verfahren patentieren, zur Darstellung von Estern aus Poly-Alkoholen und zweibasischen Säuren mit unverzweigter Kohlenstoffkette von 7–10 C-Atomen.

Auch die entsprechende Darstellung von Adipinsäure-Glyceriden ist durch Patente geschützt worden³, ebenso die Verwendung von Azelainsäure.⁴

¹ M. BERTHELOT. Ann. Chim. phys. (III) 41.216, usw. 293 (1854).

² BRUSON, A., USA-Patent 1.779.367 (1930 — Brit. Pat. 341.477 (1929). — Fabr. Dr K. Albert.

³ Siehe auch ELLIS, Chemistry of Synthetic Resins, Vol. II. New York 1935, p. 892.

⁴ Brit. Pat. 277.265 (Deutsche Gasglühlicht, Auer-Ges. 1932).

CAROTHERS¹ hat Glycol mit Sebazinsäure zu einem erweichbaren Harz verestert. Auch die Herstellung von Zitronensäure-Glyceriden ist beschrieben worden und hat teilweise zu technisch anwendbaren Produkten geführt.

Neue Kondensations-Versuche. Die bis jetzt vorliegenden Arbeiten über die Zusammensetzung und Struktur der aus Adipinsäure und Glycerin entstehenden Produkte war unzureichend. Insbesondere sind wir über die Konsistenz und die Molekülgrösse der halbelastischen Ester nicht unterrichtet. Deswegen wurde der folgende Versuch angestellt.

2 g Adipinsäure in 20 ml Benzol suspendiert und mit 5 g PCl_5 versetzt stand bei Zimmertemperatur bis alles PCl_5 verbraucht war. Die Lösung wurde bei möglichst tiefer Temperatur eingeeengt bis alles POCl_3 entfernt war. Das übrige Adipinsäuredichlorid wurde in 30 ml Benzol gelöst und tropfenweise unter Umrühren und *Abkühlen* mit einer Lösung von 1,3 g Glycerin in 3 ml Pyridin versetzt. Nach zweistündigem Stehen wurde das Benzol von dem gebildeten Öl abdekantiert. Das Öl wurde dann mit der gleichen Menge Alkohol vermischt; nachdem es sich aufgelöst hatte wurde Wasser zugegeben, die entstehenden Öltropfen setzten sich ab und der Rest wurde abdekantiert. Das Öl wurde nochmals in Alkohol gelöst, dreimal umgefällt und getrocknet.

Das getrocknete Öl wurde mit Natronlauge bei 20° in Alkohol titriert (Phenolphthalein als Indikator).

27,5 mg Öl verbrauchten 0,6 ml 0,106 n NaOH.

$$E = 27,5 / 0,6 \cdot 0,106 = 433. \quad M = 433, \text{ wenn 1 Carboxyl frei ist.}$$

Verseifung des Adipinsäure-Glycerinesters

20,4 mg Subst. in 11,0 ml 0,1-n NaOH gelöst wurde nach 3-stündigem Stehen mit 0,1 n HCl und Phenolphthalein zurücktitriert.

HCl-Verbrauch bei der Rücktitration: 9,05 ml.

NaOH-Verbrauch des Öls = 11,0 – 9,05 = 1,95 ml 0,1-n, NaOH.

$$E = 104,5$$

$M_{\min} = 209$, entspr. 1 Mol. Dikarbonsäure

2 M = 418, entspr. 2 Mol. Dikarbonsäure.

Aus den beiden Titrationen geht hervor, dass der erhaltene ölige Glycerinester Adipinsäure und Glycerin im Verhältnis 2:1 enthält.

Das Mol. Gew. ist noch nicht bestimmt worden.

Das Öl ist löslich in Aceton und Äthanol, unlöslich in Wasser, Äther, Petroleumäther und Chloroform; es löst sich in verd. Alkali und in verd. Säuren in der Wärme, kann aber durch Neutralisation nicht wieder ausgefällt werden; offenbar infolge eingetretener Zersetzung. Kongo wird irreversibel adsorbiert.

Wurde der obige Versuch so ausgeführt, dass die beiden Komponenten nicht unter Abkühlen, sondern bei Zimmertemperatur vermischt wurden, so trat starke Wärmeentwicklung ein. Als Produkt wurde unter dieser Bedingung eine hellbraune,

¹ W. H. CAROTHERS u. J. W. HILL, J. Am. Chem. Soc. 54, 1566 (1932).

elastische Masse erhalten, die in allen üblichen Lösungsmitteln unlöslich ist. Auch verdünnte Säuren lösen nicht, dagegen 2-n Natronlauge beim Kochen. Kongo wird adsorbiert.

Weitere Kondensationsprodukte der Adipinsäure und Sebacinsäure

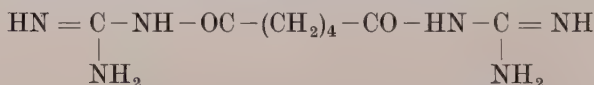
Adipinsäure und Guanidin

2,5 g Adipinsäuredichlorid wurde in benzolischer Lösung mit 1,3 g festem Guanidinhydrochlorid auf dem Wasserbad unter Rückfluss 2 Stunden gekocht. Die ungelösten Krystalle wurden dann abfiltriert, mit Benzol gewaschen und getrocknet. Sie wurden hierauf in Wasser suspendiert und bis zum Eintreten alkalischer Reaktion mit NaOH versetzt. Es bildeten sich kleine braune Prismen, welche abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurden. Das Rohprodukt, 100 mg, schmolz bei 225° unter starker Zersetzung. Durch Umkrystallisieren in Wasser änderte sich der Schmelzpunkt nicht. Substanz (HH 84) ist chlorfrei; sie ist löslich in heissem, schwerlöslich in kaltem Wasser, schwerlöslich in Alkohol, leichtlöslich in Eisessig.

Analyse: Mikro-Dumas. Gefunden, N 35,15 %

Berechnet für $C_8H_{16}O_2N_6$ 36,82 %

Der Sbst. 84 kommt also die folgende Struktur zu:



Adipinsäure und Phenylhydrazin

Mischt man 1 g Adipinsäure in Lösung mit 1 g Phenylhydrazinchlorid und 2 g Kaliumacetat in 5 ml Wasser, so geht die Adipinsäure in Lösung und ein Reaktionsprodukt fällt aus. Dasselbe geht durch Erwärmen wieder in Lösung und scheidet sich beim Abkühlen als lange, bräunliche Nadeln vom Schmp. 105–105,5° ab. Durch Umkrystallisieren werden weisse prismatische Nadeln von Schmp. 109,5–110° erhalten. Aus der Titration mit Natronlauge wurde ein Äquivalentgewicht von 122 erhalten, wonach ein Salz vorlag, bestehend aus 1 Mol. Adipinsäure und 1 Mol. Phenylhydrazin (berechnetes Äquivalentgewicht 127).

Mit FeCl_3 in konz. Schwefelsäure gibt die Subst. *keine* Farbenreaktion. Durch Erhitzen auf 175° wird die Sbst. in ihre Komponenten Adipinsäure und Phenylhydrazin zerlegt.

Da bei obigem, bei Zimmertemperatur ausgeführten Versuch nur das Phenylhydrazinsalz der Adipinsäure erhalten worden war wurde die gleiche Reaktionsmischung im Bombenrohr 24 Stunden auf 160° gehalten. Nach einem weiteren Tag fiel in der erkalteten Röhre ein braunes, nicht krystallisierendes Öl und ein krystallinisches Produkt aus. Das Bombenrohr wurde geöffnet, die Lösung filtriert und der feste Anteil zuerst mit Wasser und schliesslich mit Methanol gewaschen, wobei alles Öl in Lösung ging. Die abfiltrierten Krystalle wurden aus Alkohol umkrystallisiert und in Form rhombischer Blättchen mit dem Schmp. 206–207,5° erhalten. Die Substanz erwies sich als identisch mit dem von J. SCHEIBER¹ dargestellten Adipin-

¹ J. SCHEIBER, Ber. 44, 2428 (1911).

säure-bis-phenylhydrazid. Diese Substanz liefert, wie die in analoger Weise mit Sebacinsäure dargestellte Verbindung in konz. Schwefelsäure mit FeCl_3 eine rote Farbenreaktion.

Adipinsäure-dichlorid und Adipinsäure-dihydrazid

1 g Adipinsäuredihydrazid wurde mit 1 g Adipinsäure-dichlorid in benzolischer Lösung versetzt; nach Zusatz von 2 ml Pyridin wurde die Reaktionsmischung 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach 12 Stunden wurde das abgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Benzol und dann mit Wasser gewaschen. Es wurde dann in abs. Alkohol suspendiert und auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Abfiltrieren des ungelösten Rückstandes wurde dieser mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Schmp. 300–302°.

Das Produkt ist unlöslich in sämtlichen organischen Lösungsmitteln, auch in Eisessig. Es löst sich in konz. HCl und in heisser verd. HCl.

Diese Subst. 87, adsorbiert Kongorot.

Sebacinsäure und Phenylhydrazin

Das Sebacinsäure-bis-phenylhydrazid wurde in analoger Weise dargestellt (Erhitzen im Bombenrohr 18 Stunden bei 170°). Das nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Alkohol analysenreine Produkt, das in prismatischen Blättchen krystallisiert schmolz bei 187–187,5°.

Die Krystalle sind unlöslich in Wasser und Äther und in kaltem Alkohol; schwerlöslich in heissem Alkohol. Unlöslich in Alkali und in 4 n. Salzsäure, löslich in konc. Salzsäure.

Durch Umkrystallisieren aus Eisessig werden rechteckige Blätter erhalten.

Analyse. Eine Mikrostickstoffbestimmung nach DUMAS ergab:

Gef. N	14,67 %
Ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}_4$	14,65 %

Der Subst. kommt also die Formel zu:



Dieses kettenförmige Sebacinsäure-Derivat adsorbiert Kongo aus neutraler Lösung nicht, während die – der Analyse nach – ringförmigen Substanzen Kongo adsorbieren.

Sebacinsäure und Äthylendiaminhydrat

Das von uns früher¹ angegebene Verfahren zur Darstellung eines Kondensationsproduktes aus 3 Mol. Sebacinsäure und 2 Mol. Äthylendiaminhydrat wurde folgendermassen vereinfacht:

3 Mol. Sebacinsäure und 2 Mol. Äthylendiaminhydrat wurden in einer Bombenröhre mit 3 ml Wasser versetzt. Das Gemisch wurde 17 Stunden lang auf 160° erhitzt. Nach dieser Zeit fiel ein Öl aus, das beim Abkühlen sofort krystallisierte. Das Rohprodukt, mit Wasser ausgekocht und getrocknet, wurde dreimal aus Eisessig umkrystallisiert, wobei der Schmp. auf 250–252° stieg. Die Subst. erwies sich mit der früher erhaltenen durchaus identisch.

¹ EULER, HASSELQUIST und LÖÖV, Dieses Arkiv 1, Nr. 37 (1949).

Neue Versuche über die oxydative Spaltung der Stearinsäure in zweibasische Säuren

Versuch A 24 Stunden.

120 g Stearinsäure + 80 ml konz. Schwefels. + 600 ml rauch. Salpeters spec. Gew. 1,52. Stearinsäure wurde mit konz. Schwefelsäure auf dem kochenden Wasserbad erhitzt bis eine homogene Lösung entstand, worauf 25 ml Salpeters. vorsichtig zugesetzt wurden (starke Entwicklung von nitrosen Gasen). Mit Pausen von etwa 5 Minuten wurden im ganzen 600 ml Salpetersäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann noch 24 Stunden auf 100° gehalten und hierauf mit 2 Liter Wasser verdünnt. Dadurch fiel ein Öl aus, das nach einiger Zeit krystallisierte (AB), abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde. Filtrat C.

AB wurde mit 500 ml Wasser und hierauf mit Petroleumäther ausgekocht. Der ungelöste Rückstand A wurde abfiltriert. Filtrat = B.

A wurde zweimal aus Benzol und zweimal aus Methanol umkrystallisiert, worauf der Schmpt der Krystalle konstant bei 109–110,5° blieb. Diese Subst. 1,3 g ist in siedendem Wasser sehr wenig löslich und fällt schon bei geringer Abkühlung in Form kleiner farbloser Nadeln aus. Löslich in Alkohol und Äther, sowie in warmem Benzol, unlöslich in kaltem Benzol.

Bei der Titration mit NaOH in Alkohol mit Phenolphthalein wurden die folgenden Werte erhalten: 9,95 mg Sbst. verbrauchten 0,875 ml 0,106-n NaOH.

$$E = \frac{9,95}{0,875 \cdot 0,106} = 107,5 \quad M = 215$$

Dieses Ergebnis und die Eigenschaften der Sbst. deuten darauf hin, dass Nonandikarbonsäure vorliegt, deren Mol. Gew. sich zu 216 berechnet, und deren Schmpt. zu 110° angegeben wird.

Das Filtrat C wurde dreimal aus Äthylacetat und viermal aus Wasser umkrystallisiert und lieferte 1,2 g reine Korksäure vom Schmpt. 139–140°.

Die wässrigen Mutterlaugen der Korksäure wurden successive bis je zum halben Volumen eingengt. Die Schmelzpunkte der drei ersten Ausscheidungen stiegen hierbei, dann blieb der Schmpt. konstant bei 148°. Die kompakten Prismen wurden in alkoholischer Lösung titriert.

24,5 mg Sbst. verbrauchten 3,25 ml 0,106-n NaOH.

$$E = \frac{24,5}{3,25 \cdot 0,106} = 71 \quad M = 142$$

Das Mol. Gew. der *Adipinsäure* berechnet sich zu M = 146. Der Schmpt der *Adipinsäure* liegt bei 153°. Mischschmelzp. gab keine Depression.

Bestimmung der Säure-Zahlen SZ der bei der oxydativen Stearinsäure-Spaltung gebildeten Dikarbonsäuren

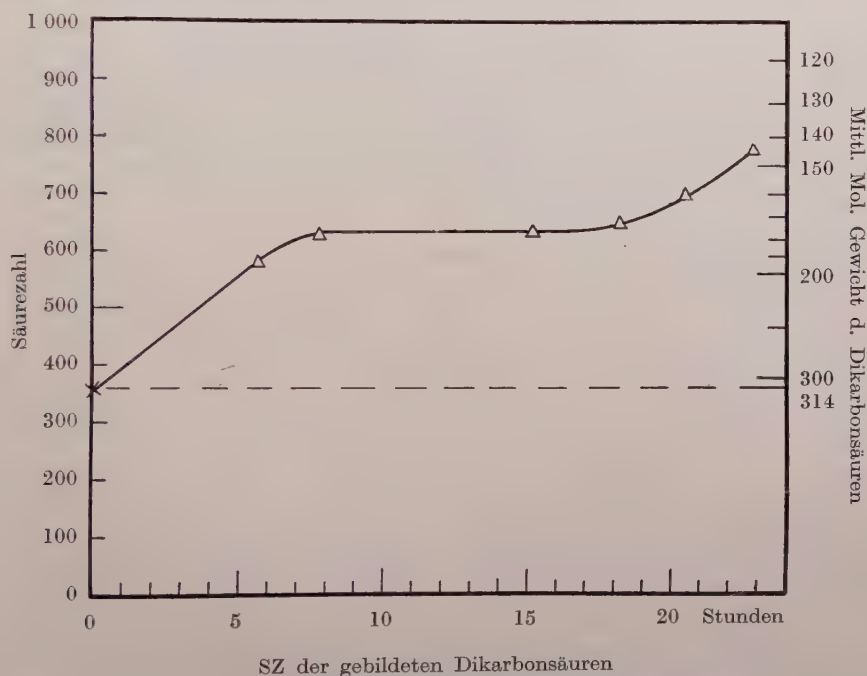
Die Untersuchung wurde in folgender Weise mit je 10 ml (Anfangsgehalt 1,45 g Stearinsäure) durchgeführt:

1. Die Probe wird mit 20 ml Wasser im Scheidetrichter verdünnt;
2. Ausschütteln 2 mal mit je 10 ml Petroleumäther;

3. Die Dikarbonsäureschicht (Wasserlösung) wird 2 mal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt;
4. Die Ätherschicht wird mit wasserfreiem Natriumsulfat. NaAc getrocknet, eingedunstet und gewogen (Gewicht d. Dikarbonsäuren).
5. Von den getrockneten Dikarbonsäuren werden c:a 40 mg abgewogen, in wenig Alkohol gelöst und mit NaOH titriert (SZ).

Stunden	5,5	7,75	15,25	18,25	20,5	22,75
Gewicht d. Dikarbonsäure in g	0,9	0,87	0,91	0,97	1,0	1,23
Säurezahl der obigen Dikarbonsäuren...	583	632	635	647	695	779

Aus der folgenden Figur geht der Verlauf der Dikarbonsäurebildung während der oxydativen Stearinsäure-Spaltung hervor.



× Theoretischer Ausgangspunkt, berechnet für Hexadekan-dikarbonsäure ($M = 314$)

Versuch B. 5 Stunden.

Gemischt wurden: 120 g Stearinsäure, 80 ml konz. Schwefelsäure und 450 ml Salpetersäure, spec. Gew. 1,52.

Reaktionszeit 5 Std.; Temperatur 100° .

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Gemisch mit 2 l Wasser verdünnt und blieb 24 Stunden stehen. Die Fällung bestand aus einer schmierigen Krystallmasse, welche abfiltriert, mit Wasser gewaschen und mit siedendem Petroleumäther extra-

hiert wurde. Der Petroleumäther wurde abdestilliert. Das Gewicht der unveränderte Stearinsäure betrug 19.8 g. Somit sind in 5 Std. 100,2 g oxydiert worden.

Die mit Petroleumäther ausgekochte Krystallmasse wurde in Benzol gelöst. Nach Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat wurde aus der Lösung erhalten:

Krystallisat I, Schmpt. 77–85°. Gew. 3,3 g.

Krystallisat II Die schmierigen Krystalle wurden aus Äthylacetat umkrystallisiert, Schmpt. 115–120°. Durch Titration mit Natronlauge ergab sich das Mol. Gew. 226. Es kann hier *Dekandikarbonsäure* vorliegen, deren Schmpt. zu 124° angegeben wird. Ausbeute 2 g.

Aus der Mutterlauge des Krystallisates II welche mit Petroleumäther gefällt wurde, fielen 50 ml eines Öles aus, welches bei der Titration mit Natronlauge ein mittleres Mol. Gew. von 280 ergab, was auf Dikarbonsäuren mit 15–16 C-Atomen schliessen lässt.

Ein Versuch C, mit der Reaktionszeit 3 Stunden ergab 20,2 g unveränderte Stearinsäure aus 120 g Stearinsäure und somit sind 99,8 g oxydiert worden. Bei diesem Versuch konnten 3 g reine *Nonandikarbonsäure* isoliert werden.

Stockholm, Universität, Inst. für org.-chem. Forschung.

Tryckt den 3 mars 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

On the luminescence of phosphors of the aluminium oxide-calcium fluoride type activated with manganese

By GUNNAR GÜNTHER, GORDON ANDERSON and HARALD PERLITZ

With 7 figures in the text

Phosphors consisting of aluminium oxide as base material and activated with small amounts of heavy metals have early been prepared and examined by various investigators. Among the different activating metals manganese generally plays a dominating part, as it seems to give the phosphors high luminous intensities or, differently expressed, good quantum efficiencies. Thus the majority of efficient phosphors with various colours of light that have gained any technical importance, contain as an activator manganese, either alone or in combination with some other heavy metal.

Already LECOQ DE BOISBAUDRAN^{1 2} found that with cathode rays as excitation source aluminium oxide produced a green fluorescence, this being confirmed also by the investigations of ARNOLD.³ WIEDEMANN and SCHMIDT⁴ discovered variations in the cathode-luminescence from red to yellow and green depending on the temperature and the length of time of the heat treatment. The longer heated specimens were more homogeneous and produced only green and yellow luminescence. Using oxides treated at an higher temperature (1300° C) IZAWA⁵ observed an intense green cathodoluminescence, whilst TANAKA⁶, and TIEDE and PIWONKA⁷ under similar conditions observed a red luminescence. IWASE⁸ showed the cathode-luminescence to consist of two spectral bands, one in the orange and the other in the green, and further that a higher heating temperature greatly intensifies the green band, as compared with the orange one. He showed also that an increase of the manganese concentration gradually led to total fading of the luminosity, particularly that of the green band. If, however, the manganese content was less than 0.015 mg per gram of aluminium oxide, IWASE observed a red luminescence that changed into green with a still higher manganese concentration.

Not until recent times did the photoluminescence of manganese-activated phosphors of aluminium oxide attract more general attention. TIEDE and PIWONKA⁷ reported a red fluorescence under long-wave ultra-violet (300–400 m μ) excitation, while RANDALL⁹ observed faint fluorescent bands with maxima at 6240, 5100 and 4275 Å. On account of the investigations of FROELICH¹⁰ and KRÖGER¹¹ it has been possible to improve considerably the aluminium oxide phosphors containing manganese. This was attained by introduction of certain basic oxides promoting the development of specific crystalline modifications. These phosphors showed even an intense red luminosity. In the present paper an account will be given of the prop-

erties of another type of aluminium oxide phosphors, viz. those modified by calcium fluoride and activated with manganese.¹² The primary aim in developing these phosphors characterized by a distinct red fluorescence when excited with long-wave ultra-violet radiation, was to obtain a maximum of photoluminescence.

Methodical

Preparation of the phosphors.

The phosphors were made from highly purified preparations of $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and CaF_2 or, in certain cases, another alkaline earth fluoride, and $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. The checked amount of iron was less than 0.0005 %. The sulphates mentioned, in proper proportions for the compositions aimed at, were ground simultaneously for one hour in a ball mill, with acetone as wetting agent. The wet mixture thus obtained was dried and heated slowly to 900°C until all development of sulphur trioxide had ceased. The loose mass now obtained was milled dry together with the fluoride so as to form a perfectly homogeneous mixture which, in a covered crucible of quartz or platinum, was heated in air in a platinum-wound resistance furnace. The final furnace temperature was 1400°C , and the baking time at this temperature was two hours. The superficial layer of the sintered body was then removed and the remainder (of faint pink colour in daylight) could be easily pulverized in a mortar. In the cases where the specimens were subjected to a subsequent heat treatment in a reducing atmosphere, this was accomplished in a dry hydrogen atmosphere at 1300°C in an electrical tungsten tube furnace. As a result of this treatment, the pink colour vanished and the specimens became entirely colourless.

Excitation sources for phosphors.

For excitation by long- or short-wave ultra-violet radiation the Luma Analyst's Cabin of the two-lamp type was used.^{13 14} The $3650\text{ \AA}$ radiation was supplied by a mercury vapour high-pressure lamp provided with an outer bulb of black glass containing nickel oxide (Luma HgU 120). The $2537\text{ \AA}$ radiation was supplied by a low-pressure quartz tube containing argon and mercury from which the visible radiation was filtered off by means of a special plate of nickel-cobalt glass of 2 mm thickness and good ultra-violet transmission.

For X-ray irradiation the Philips' equipment »Type Metalix» was used, the visible radiation being absorbed by a thin aluminium foil filter.

Fig. 1 shows the design of the apparatus used for examination of the specimens subjected to cathode rays. The electron source (glow cathode) consists of a tungsten coil activated with oxides of alkaline earths and thorium. It is surrounded by a focusing electrode (b). From the glow cathode the electrons are accelerated by the two cylindrical anodes (c_1 and c_2) and strike the fluorescent material (d) to be examined. The specimens can be interchanged easily, as the glass plate (e) is pressed to the end of the apparatus only by the external air pressure. In order to prevent the activated cathode from being damaged by air rushing in when the bottom plate is removed, nitrogen or argon can be introduced into the cathode ray tube through the valve (f). The evacuation is accomplished by two pumps, an oil pump for the pre-vacuum and a molecular pump for the final high vacuum. Thus the pumping process involves no risk of mercury vapours. A Pirani manometer is used as vacuum gauge.

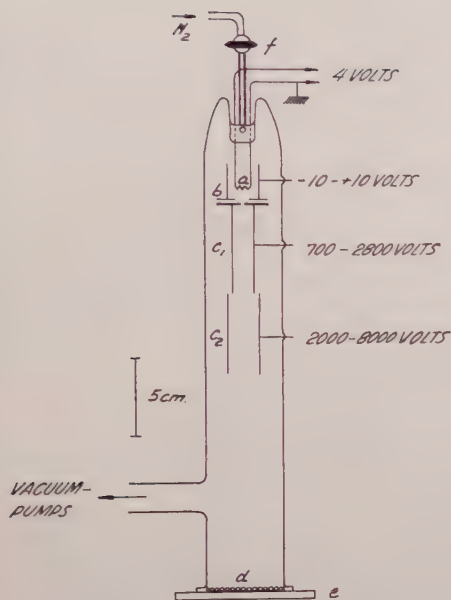


Fig. 1. Cathode ray tube.

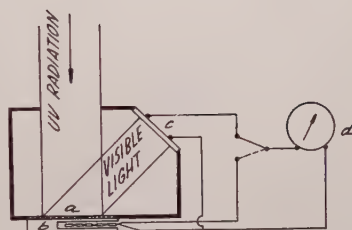


Fig. 2. Apparatus for measuring fluorescent intensity.

Measuring equipment.

For taking photographs of emission spectra a Hilger fully automatic, large quartz and glass spectrograph (E478) was used. Powder diagrams of the phosphors were obtained in self-focussing cameras using Cr-*K*-radiation.

For measuring the fluorescent intensities of the phosphors an apparatus was used, diagrammatically shown in fig. 2. The ultraviolet radiation was directed to strike the specimen (a), spread out as a thin coating on a thin horizontal metal plate provided with a hole for a thermo-couple (b). The luminescent radiation from the phosphor was measured with a red-sensitive selenium photo-cell (c) which, like the thermo-couple, could be connected to a mirror galvanometer (d). The temperature of the phosphor could be varied by bringing the plate (b) into contact with a small electric hot-plate or, if temperatures below room temperature were desired, a plate cooled by »dry ice» and gradually warmed up by the surrounding air.

Experimental

Chemical composition.

In preparing phosphors, a common practice is to add some melting agent or flux in quantities amounting to a few percentage. As fluxes in frequent use may be mentioned halides of alkali metals, alkaline-earth metals and others. Thus FROELICH¹⁰, for instance, used 4% AlF_3 in preparing his red-emitting strontium aluminate. While preparing Mn-activated aluminium oxide with calcium fluoride as a flux, we found the luminescent intensity of the different specimens excited by 3650 Å to be very dependent on the concentration of the flux. Fig. 3 shows the relation of the red luminescent intensity to the proportion of calcium fluoride con-

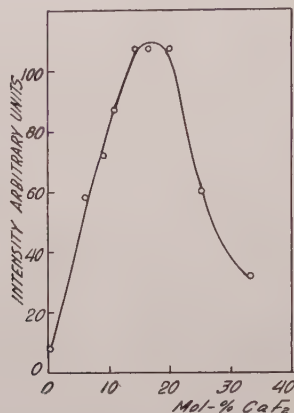


Fig. 3. Relation between fluorescent intensity and mole-percentage of CaF_2 in $x\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$ ($0.45 \cdot 10^{-1}$ weight-percentage Mn). Excitation by 3650 Å.

tained in the phosphor. A distinct maximum is obtained with a composition of 1 mole of CaF_2 per 4–6 moles of Al_2O_3 . As this most favourable fluoride concentration exceeds the usual amount of flux, the calcium fluoride may reasonably be considered an essential component of the base material of the phosphor. The marked optimum, besides, indicated the formation of a specific crystal structure on which the luminescence was dependent. This assumption was fully confirmed by an X-ray examination. Fig. 4 shows powder diagrams of a series of aluminium oxides with different concentrations of calcium fluoride. It is apparent that with an increasing amount of calcium fluoride the α -(corundum) structure (Fig. 4 a) is gradually displaced by a new structure closely related to » β -aluminium oxide»¹⁵ (Fig. 4 e). In a composition with say 5 moles of Al_2O_3 per 1 mole of CaF_2 , the » β -structure» is the only one present. Obviously the » β -structure» is essential for producing the observed luminescent effect. Again, with still increasing amounts of calcium fluoride the luminescence decreases, and it is reasonable to explain this by the gradual displacement of the » β -structure» by the next intermediate phase as evi

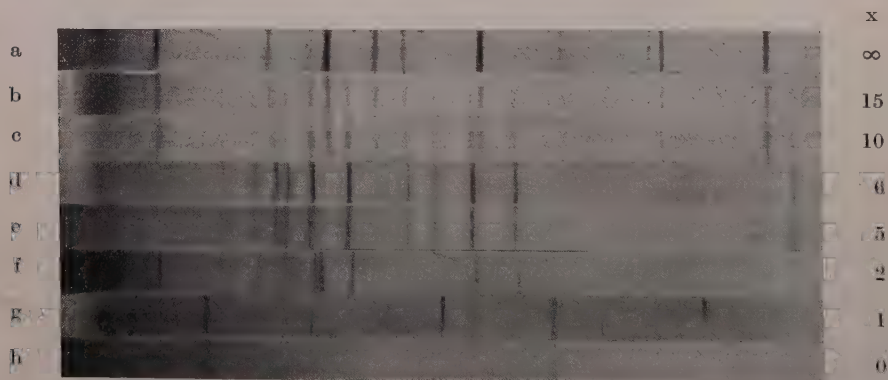


Fig. 4. X-ray diffraction patterns in the $x\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$ system ($0.45 \cdot 10^{-1}$ weight-percentage Mn).

denced by successive diffraction patterns and the fact that only poor photoluminescence is obtained with calcium fluoride activated solely with manganese. It was this luminescent effect that led to the discovery of the new structure mentioned above, a structure not shown in PASCAL's phase diagram of the system $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$.¹⁶

A similar structure also resulted if strontium was substituted for calcium.

Activator concentration.

The luminescence of these phosphors was found to depend greatly on the manganese concentration. Fig. 5 illustrates this dependence for a phosphor of the com-

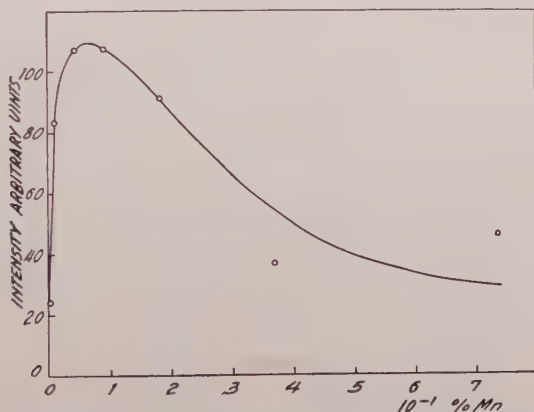


Fig. 5. Relation between fluorescent intensity and manganese content in $5\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$. Excitation by 3650 Å.

position $5\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$. The luminosity quickly increases with an increasing amount of manganese, has an optimum at 0.04–0.1 % Mn, and subsequently decreases more slowly. Specimens with higher contents of manganese frequently were found less homogeneous, judging by their luminescence. Excited by 3650 Å the various specimens showed no change in the hue of the emitted red colour.

Baking conditions.

The greatest luminous intensities were obtained from specimens baked in air, i. e. in an oxidizing atmosphere, to temperatures of 1400–1450° C. Table 1 shows the relation found between the luminous intensity and the heating temperature. One hour's baking at 1400° C is sufficient, but a prolongation does not prejudice the luminosity. An increase of the temperature from 1350° to 1400° C greatly intensifies the luminosity and most probably involves a development of the base structure of the phosphor. This is even more apparent if the phosphor is excited by cathode rays, in which case the emitted radiation changes from green to a more red-dish hue. A subsequent heating in hydrogen at about 1300° C will cause the strong red luminescence excited by 3650 Å to disappear, whilst the weaker red luminescence excited by 2537 Å will change to a bluish to yellowish white one, combined with phosphorescence.

Table 1

The dependence of intensity on the baking temperature of specimens for the phosphor $5\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2 - 0.45 \cdot 10^{-1}$ weight-percentage Mn.

Baking temperature of specimen °C	Intensity. Ar- bitrary units
1200	57
1300	69
1350	79
1400	107
1450	112

Emission spectrum.

The fluorescence spectrum of a specimen of $5\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$ baked in air with $0.45 \cdot 10^{-1} \% \text{ Mn}$ is reproduced in fig. 6, the exciting radiation being $3650 \text{ \AA}$. The spec-

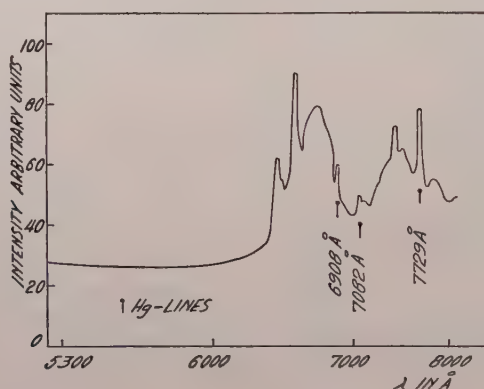


Fig. 6. Emission spectrum of $5\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$ containing $0.45 \cdot 10^{-1}$ weight-percentage Mn. Excitation by $3650 \text{ \AA}$.

trum consists of two bands, one in the orange-red, the other one in the infra-red. The former starts sharply at $6400 \text{ \AA}$ and vanishes at $6900 \text{ \AA}$. It has three maxima — a weak one at $6410 \text{ \AA}$, a strong and steep one at $6550 \text{ \AA}$, and a broader one around $6700 \text{ \AA}$. The infra-red band extends from $7350 \text{ \AA}$ to $8200 \text{ \AA}$ where it is sharply cut off. The spectrum shows also three mercury lines indicated by special marking. Remarkable is the strong and narrow maximum at $6550 \text{ \AA}$ which has a width of only $35 \text{ \AA}$.

No noteworthy changes in the emission spectrum could be observed for the specimens with different contents of calcium fluoride or manganese, as long as ultra-violet excitation was used, contrary to what occurred under excitation by cathode rays.

Dependence of the luminescence on temperature.

The dependence of the red photoluminescence on the temperature was investigated taking into account the compositions of the phosphors and the process of manufacture involved. However, no essential difference between the several phosphors could be noticed, and the curve given in Fig. 7 may be representative

of the whole groupe. Already at room temperature the luminous intensity is maximum and hardly increases at lower temperatures, not even at as low as liquid air's. Nor could any formation of new emission bands be detected. With rising temperatures the photofluorescence fades more or less uniformly until practical extinction at -120°C . The phosphors prepared under oxidizing conditions also failed to develop any phosphorescence, though in certain cases after reduction of the phosphors there was some phosphorescence.

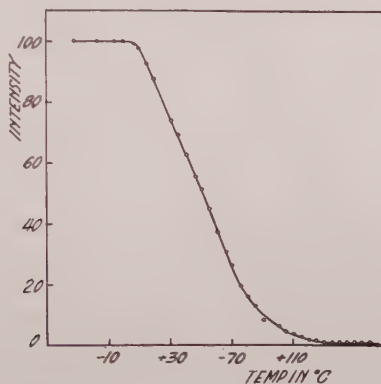


Fig. 7. Dependence of fluorescence on temperature for $5\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$ containing $0.45 \cdot 10^{-1}$ weight-percentage Mn. Excitation by $3650 \text{ \AA}$.

Excitation features of the phosphors.

Excited by 3650 and $2537 \text{ \AA}$ the emission was red in all cases though of variable luminosity. Under bombardment with electrons, however, the emission varied considerably in colour, according to the pre-history of the specimens. With an increasing content of manganese, specimens of the composition $5\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$ showed a shift from red towards green. The same tendency also was observed if the amount of CaF_2 was increased, the optimum manganese content remaining constant. An increase of the heating temperature, on the other hand, favoured a shift of the emission towards greater wavelengths. Besides, under the action of electrons having different speeds it was noticed in some cases a less difference in the emission colour of the phosphors. Assuming that similar conditions prevail for phosphors of aluminium oxide activated with manganese but without calcium fluoride, it is easy to explain the earlier conflicting observations. The emission colour depends on the content of manganese, the heating temperature and the speed of the exciting electrons.

The above-mentioned observations refer to specimens heated in air. Of interest is the occurrence of new, bluish-yellowish white fluorescent colours under excitation by $2537 \text{ \AA}$ after reduction with hydrogen. The developed hue showed to be very dependent on the reduction temperature and generally was drawn with higher temperature towards green. The effect is apparently related to the presence of calcium fluoride, because no such effect is present in aluminium oxide activated with manganese, with or without additional oxides of calcium and magnesium, if prepared according to KROEGER.¹¹

The reduced specimens, excited by electrons (6 kV), all showed a distinct green fluorescence.

If excited by X-rays ($\sim 1 \text{ \AA}$), some of the specimens, especially the reduced ones, emitted a weak green fluorescence.

SUMMARY

The conditions for the preparation of phosphors of the $x\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaF}_2$ type, activated with manganese, have been ascertained and the character of the luminescence as well as its relation to the chemical composition and the crystal structure of the phosphors have been studied.

The Research Laboratory of Lumalampan AB, Stockholm.

REFERENCES. (1) Lecoq de Boisbaudran, *Compt. rend.* 103 (1886), 1107. — (2) —, *Ibid.* 105 (1887), 261. — (3) Arnold, W., *Ann. Physik u. Chem.* 61 (1897), 318. — (4) Wiedemann, E., and Schmidt, G. C., *Ann. Physik u. Chem.* 56 (1895), 213. — (5) Izawa, S., *J. Soc. Chem. Ind. Japan* 36 (1933), 43 B. — (6) Tanaka, T., *J. Optical Soc. Am.* 8 (1924), 287. — (7) Tiede, E., and Piwonka, R., *Ber.* 64 (1931), 2252. — (8) Iwase, E., *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Research (Tokyo)* 34 (1938), 767. — (9) Randall, J. T., *Proc. Roy. Soc. (London) A* 170 (1939), 291. — (10) Froelich, H. C., U. S. 2,392,814, Jan. 15, 1946. Priority 1943. — (11) Kröger, F. A., *Some Aspects of the Luminescence of Solids.* Amsterdam (1948). — (12) Günther, G., and Andersson, G., Swedish patent application 2676/48. — (13) Günther, G., *Kem. Maanedstidning* 30 (1949), 44. — (14) —, *Tidskr. för Ljuskultur* 21 (1949), 53. — (15) Beevers, C. A., and Brohult, S., *Z. Krist.* 95 (1936), 472. — (16) Pascal, P., *Elektrochem.* 19 (1913), 611. — *J. Am. Ceram. Soc. Phase Diagrams for Ceramists*, Nov. 1, 1947. Part II, 123.

Tryckt den 3 mars 1950.

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Ordered aggregation of salted out and dried bacterial flagella

By CLAES WEIBULL

With 6 plates

Some results from a study on the aggregation of salted out bacterial flagella have been reported previously (1), as well as the methods for the preparation of the flagella used in the experiments described (2, 3). Some more facts about the salting out have now been obtained and will be discussed together with a morphological study on films, obtained by drying flagellar solutions in distilled water on glass slides. Here also aggregation phenomena have been observed.

Experimental methods

For the investigations with a light microscope a Zeiss phase contrast microscope, Lumipan, was used in most cases. The salted out material was especially difficult to observe without using phase contrast. Plates II and IV were taken with a $40\times$ objective without oil immersion, and plates I and III with a $90\times$ objective with oil immersion. For plates II and IV a camera with 13 cm distance between eyepiece and photographic plate was used, otherwise a distance of 40 cm was employed.

The electron micrographs were taken with a 90 Kv Siemens electron microscope, electron optical magnification $8000\times$. For making the prints of the dried flagellar films, the films on the glass slides were shadowed with gold according to the technique of WILLIAMS and WYCKOFF (4). The slides were then immersed in a solution of nitrocellulose in amyl acetate and allowed to dry. They were next immersed in water. After some hours the nitrocellulose membrane which formed could easily be stripped from the glass slides with the adherent gold layer. The membrane was allowed to dry and was then investigated in the electron microscope. Gold was used for the shadowing process since it loosens easily from the glass slide. A disadvantage of the gold is that it crystallizes to some extent, giving a somewhat granular appearance to the subjects studied in the microscope (cf. (2)).

The only way to get proper slices of the flagellar films when cutting them at right angles to the surface in the microtome, was by fixing them in absolute alcohol, washing in alcohol-ether and mounting in celloidine. — Examination of the film in the light microscope before and after the fixation showed no alteration in the surface structure.

Results and discussion

A micrograph of salted out bacterial flagella has been published previously (1). By assuming a free rotation of the apparent wavy needles it was concluded that they formed approximately cylindrical spirals. Furthermore, it was found that the period along the spiral axis was quite constant. By using a new microcamera with longer eyepiece-plate distance (40 cm) and observing different individual spirals and focusing the microscope on different parts of the spirals, the spiral structure has been observed directly, and in addition it was noted that the spirals all are curled in the same way. Plate Ia shows a spiral with the lowest parts of the spiral focused, and Ib the highest parts focused. Since, in the phase contrast microscope, the objects strictly focused are darker than the objects out of the focus, the pictures clearly show that the photographed spiral is left handed. This has been found with all spirals investigated, at least 100.

Spiral arrangement of elongated particles when orientated in a streaming liquid has been reported by other authors (5, 6). However in this case the particles have been orientated alternately left and right handed, on account of the forces acting on the particles. In the case of the flagella, the fact that the spirals are only left handed proves that here the spiral arrangement must depend on the molecular structure of the flagella themselves. This is also in accordance with the fact that the spirals are destroyed when boiled, or denatured with formaldehyde.

The formation of coherent films on drying pools of flagellar solutions in distilled water has been described previously (4). Plate II shows a micrograph of the surface of such a film. A regular structure, a banding in dark and light parts, is easily seen. The period of the banding is slightly shorter (5–20 %) than that one reported for the salted out spirals (1), irrespective of the wavelength of the light used in the microscope.

A micrograph of the film, sliced in the microtome at right angles to the surface is shown in plate III. Here a regularly wavy structure of the surface appears. It seems very plausible to assume this wavy structure of the surface to cause the light and dark banding of the film described above. The concave parts of the surface may act as negative lenses, dispersing the light out of the aperture of the objective. In accordance with this view is the fact, that adding immersion oil directly on the film makes the bands almost entirely disappear in the microscope.

The close correlation of the period of the salted out flagellar spirals and the banding of the flagellar films leads one to suppose that also in the latter case there is a spiral or wavy aggregation of the individual flagella. This has also been shown almost conclusively to be the case (cf. below).

In most cases the dried flagellar films redissolve again when wetted with water. On prolonged exposure to low humidity, however, the films become occasionally insoluble. When such a film is shaken with water it merely breaks into pieces of irregular sizes. Plate IV is a micrograph of such a suspension of a broken film. As can be seen, all fragments have uneven, wavy edges and the smallest fragments look almost like the salted out spirals, strongly suggesting wavy or spiral arrangements of the flagella.

Electron micrographs of prints of the flagellar films also give evidence in support of this view. An electron micrograph of such a print is shown in plate V. Here the flagella lie partly together in parallel wavy bundles appearing periodically. The periodicity is the same as found in the light microscope (cf. above and plate II).

However, disoriented flagella also appear. These flagella may originate from the drying process of the film, when the flagella first arrange themselves into strict spirals but finally have to modify this structure into a more wavy one which causes disturbances in the film. — Together with the evidence given by the nature of the insoluble rendered films described above, the similarity of the period of the salted out spirals, and the banding of the films, the flagella are without doubt to the greater part arranged in a wavy manner laying together in parallel bundles.

It may be of interest to mention that only flagellar preparations of a certain degree of purity give the aggregation in spirals and banded films. More impure preparations give only amorphous precipitates and films. Intermediate forms have also been found (Plate VI). This seems to form an analogy to the classical crystallization process, where only preparations of certain degree of purity can be made to crystallize.

SUMMARY

Bacterial flagella are shown to form left handed spirals when salted out by ammonium sulphate, which must be assumed to depend on the molecular structure of the flagella themselves. Films made by drying pools of flagellar solution in distilled water have been investigated by light microscope and electron microscope. Here a wavy structure prevails with the flagella lying side by side in parallel bundles. The period of the banding of the films and of the spirals is about the same.

It is found, as an analogy to the ordinary crystallization process, that the spirals and the banded films are only formed when the flagellar preparations have a certain degree of purity.

The author is very much indebted to Prof. A. TISELIUS for his kind interest in this work and valuable discussions.

The histological work in connection with this investigation was performed at the Institute of Histology at Uppsala. The author wishes to thank the head of the institute, Prof. M. WRETE, and Miss B. SANDÉN for the preparation of these specimens, and also Dr. B. PERSSON for valuable help and suggestions.

The author is also very much indebted to Mr. G. EKLUND for most valuable assistance in taking the electron micrographs.

This investigation is part of a research program on bacterial flagella which is financially supported by the Swedish Natural Science Research Council.

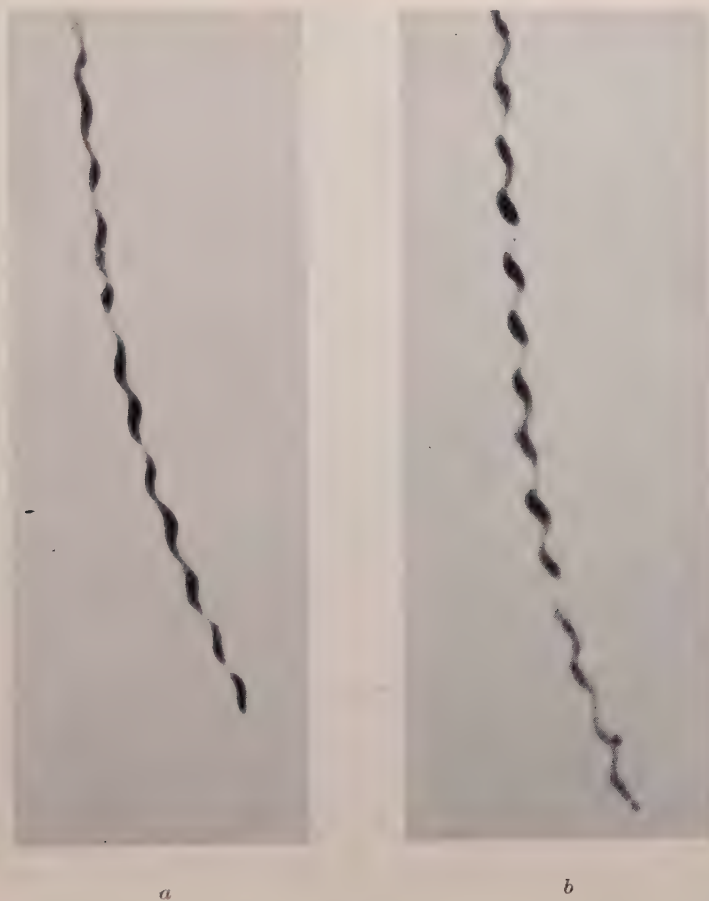
REFERENCES. 1. C. Weibull, Ark. Kem. Band 1, Nr 3 (1949). — 2. C. Weibull, Biochim. Biophys. Acta 2, 351 (1948). — 3. C. Weibull, Biochim. Biophys. Acta 3, 378 (1949). — 4. R. C. Williams, R. W. G. Wyckoff, J. Applied Phys., 15, 712 (1944). — 5. G. Van Iterson, Proc. Akad. Wetensch. Amsterdam 37, 367 (1934). — 6. J. D. Bernal, I. Fankuchen, J. Gen. Physiol. 11 (1941).

Institute of Biochemistry, University of Uppsala.

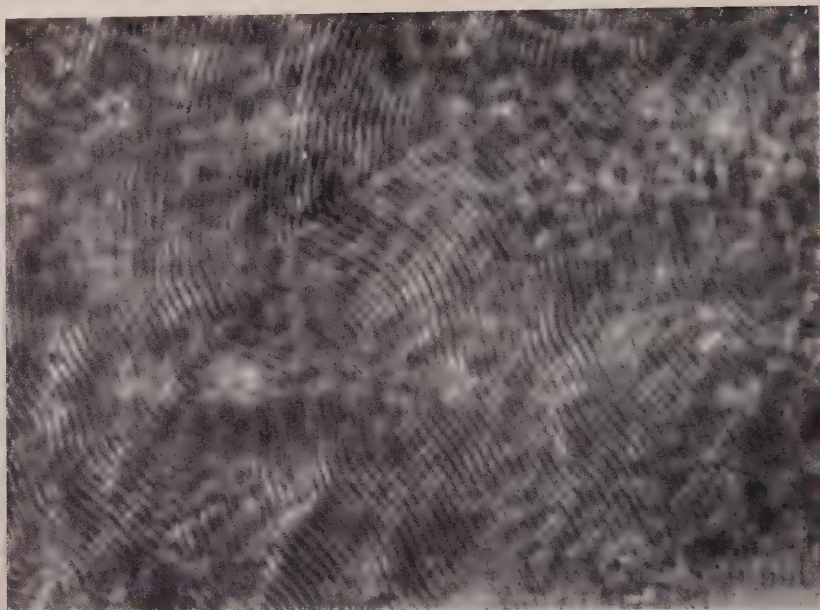
Tryckt den 15 mars 1950

Uppsala 1950. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

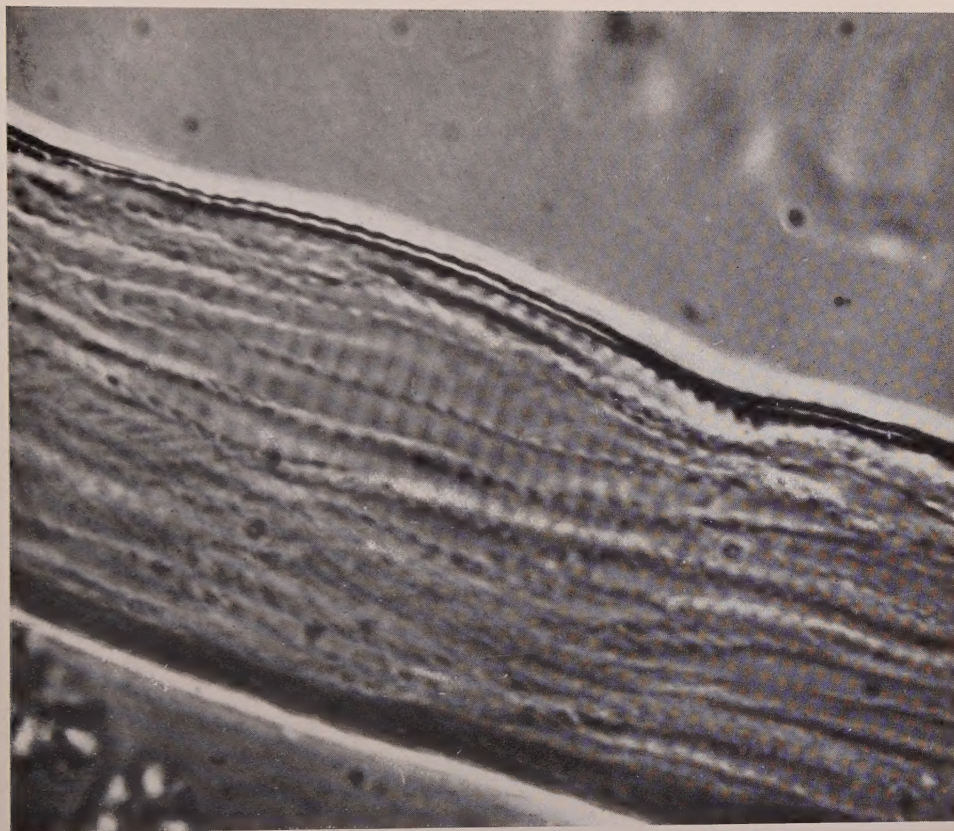




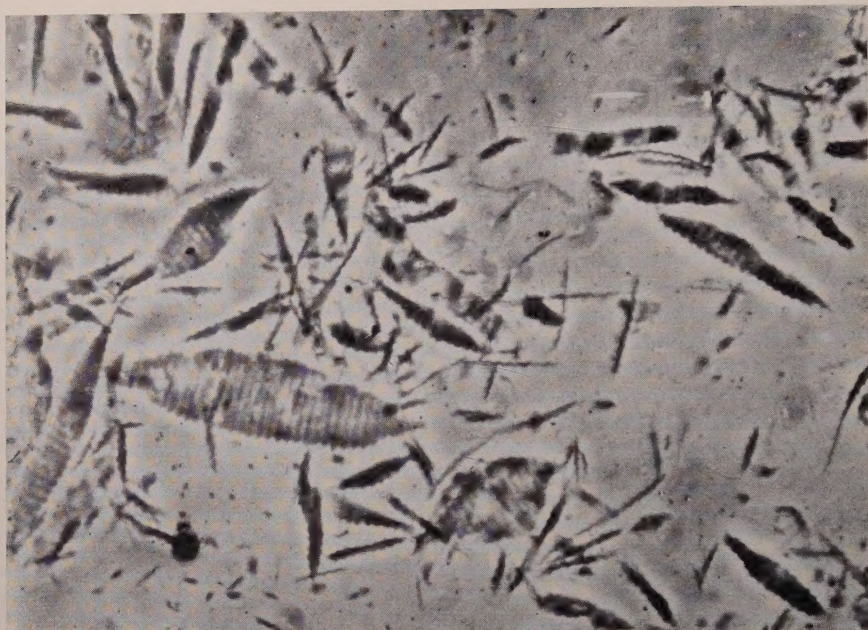
Microphotograph of a spiral, formed by salting out of flagella from *Proteus vulgaris*. In *a* the lowest parts of the spiral are focused, in *b* the highest ones.



Microphotograph of a film, formed by dried flagella. Magnification $695\times$, optically $220\times$.



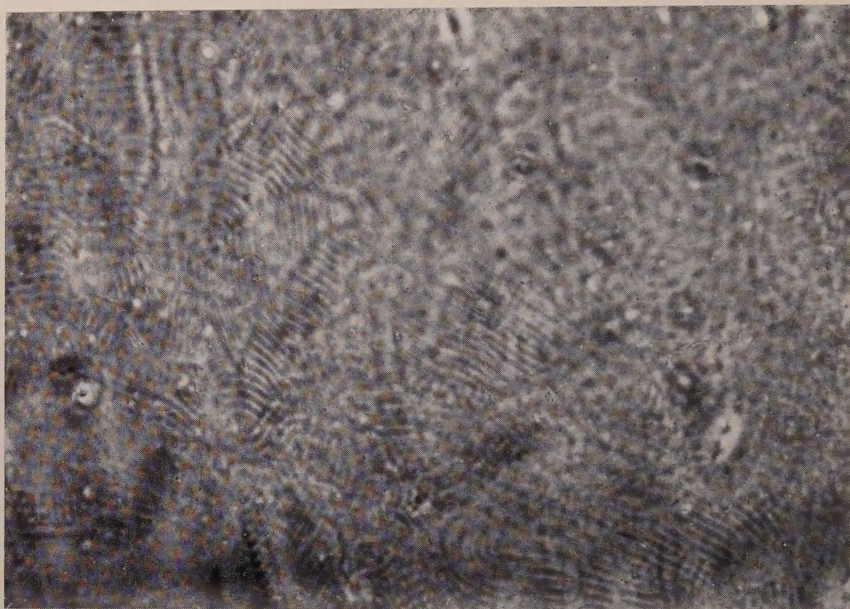
Microphotograph of a flagellar film, sliced in the microtome. Magnification $1900\times$, optically $1230\times$.



Microphotograph of a denatured flagellar film, suspended in water. Magnification $660\times$,
optically $220\times$.



Electron micrograph of a replica of a flagellar film. Magnification 25 000 $\times$, electron optically 8 000 $\times$.



Micrograph of a partly «crystallized» flagellar film. Magnification $695\times$, optically $220\times$.